

ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRICOLE



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL

DE LA

RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE E

ANNALES
DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

CONSERVATION ET TRANSFORMATION
DES PRODUITS AGRICOLES



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

7, rue Képler - Paris

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL

DE LA

RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE F

ANNALES

DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

CONSERVATION ET TRANSFORMATION

DES PRODUITS AGRICOLES



INSTITUT NATIONAL DES RECHERCHES AGRONOMIQUES

10 rue de la République - Paris

ÉTUDE SUR LES DÉFAUTS DE COAGULATION DU LAIT PAR LA PRÉSURE

PAR

G. MOCQUOT, C. ALAIS, R. CHEVALIER,

Station centrale de microbiologie et recherches laitières
Jouy-en-Josas

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction et but du travail.

PREMIÈRE PARTIE

I. — Etude des variations individuelles dans l'aptitude à la coagulation du lait chez les vaches laitières.

- A) Prélèvement des échantillons.
- B) Méthode d'examen.
- C) Résultats.
 - 1. Proportion de laits « lents » et de laits de mammite.
 - 2. Différences dans l'aptitude à la coagulation du lait produit par les différents quartiers de la mamelle d'une même vache.
 - 3. Variations observées au cours d'une lactation et au cours de plusieurs lactations successives.
 - 4. Variations du temps de coagulation au cours de la conservation.
 - 5. Comportement des laits « lents » vis-à-vis de la présure dans diverses conditions expérimentales.

II. — Observations sur certaines caractéristiques analytiques des laits à coagulation défectueuse.

- A) Méthodes d'analyse.
- B) Résultats.
 - 1. Substances azotées.
 - a) Substances azotées totales.
 - b) Caséine.
 - c) Substances azotées solubles.
 - 2. Les différentes formes du calcium et du phosphore dans le lait en relation avec l'aptitude à la coagulation.
 - a) Calcium et phosphore totaux du lait.
 - b) Calcium et phosphore solubles.
 - c) Calcium et phosphore insolubles.
 - 3. pH et acide citrique.

DEUXIÈME PARTIE

I. — Influence respective des constituants solubles et des constituants insolubles sur le comportement du lait vis-à-vis de la présure.

A) Technique de la centrifugation.

1. Fonctionnement de l'appareil.
2. Récolte des produits centrifugés.
 - a) En vue de leur étude analytique.
 - b) En vue de la reconstitution d'un lait mixte.
3. Remarques sur la mise en suspension des sédiments obtenus sur la paroi du bol.
4. Influence de la centrifugation et de l'homogénéisation sur le temps de coagulation du lait par la présure.
5. Fidélité de la technique employée.

B) Application de la méthode au cas des laits « lents » et « rapides ».

1. Prélèvement et conservation des échantillons.
2. Détermination de la durée de coagulation par la présure.
3. Résultats.

II. — Relation entre l'aptitude du lait à coaguler par la présure et les caractères des sédiments et lactosérums obtenus par supercentrifugation.

1. Aspect des sédiments et lactosérums.
2. Teneur en eau.
3. Comparaison entre la teneur en eau du paracaséinate et du phosphocaséinate.
4. Proportion de caséine sédimentée au cours de la supercentrifugation.
5. Teneur comparée en calcium et phosphore des sédiments obtenus après 5 minutes et après 1 heure de centrifugation.
6. Affinité pour l'eau des sédiments de lait mixte.
7. Étude du comportement vis-à-vis de la présure des sédiments et des lactosérums de supercentrifugation.
 - a) Action de la présure sur les sédiments.
 - b) Action de la présure sur les lactosérums.
8. Stabilité des caséinates alcalins obtenus à partir de laits « lents » et de laits de « mélange » vis-à-vis de divers agents précipitants (chlorure de calcium, alcool).

Discussion.

Résumé.

Bibliographie.

INTRODUCTION ET BUT DU TRAVAIL

La coagulation par la présure est un stade essentiel de la fabrication du fromage.

L'art du fromager consiste en effet à exploiter au mieux les propriétés du « gel » résultant de la transformation de la caséine en paracaséine pour séparer la majeure partie des substances grasses et azotées du lait et les mettre en « forme » ⁽¹⁾ lorsque l'expulsion d'eau — ou « égouttage » — atteint un degré suffisant. Cette « mise en forme » conditionne en grande partie la maturation et la conservation ultérieures du fromage.

On sait déjà (1), (2) et (3) que des échantillons de laits « individuels », c'est-à-dire des échantillons prélevés sur les différentes vaches qui constituent un troupeau, présentent entre eux de grandes variations dans la durée de coagulation par la présure et dans les propriétés rhéologiques du coagulum. L'aptitude à la formation du gel que possède le lait de « mélange » provenant de toutes les vaches d'un troupeau résulte donc de la somme des aptitudes diverses des laits individuels et reflète l'état d'équilibre qui s'établit entre ces laits individuels après leur mélange.

Un examen attentif et poursuivi pendant une période de temps assez longue (plusieurs mois et parfois plusieurs années) révèle à son tour entre les laits de plusieurs troupeaux des différences d'aptitude à la coagulation qui sont moins accusées que celles observées avec les laits individuels mais cependant bien nettes et qui intéressent des caractères importants à considérer pour la fabrication du fromage. Ce sont en particulier :

- a) la facilité plus ou moins grande avec laquelle le gel formé par la présure se déshydrate,
- b) l'élasticité, la plasticité et les autres propriétés rhéologiques du fromage.

Ces propriétés varient quelque peu suivant le lieu et le troupeau : c'est la constatation vers laquelle on est conduit dans les régions où le fromage se fabrique dans de petites fromageries, ou à la ferme, en rassemblant le lait d'un nombre limité d'animaux (100 à 200 vaches par exemple).

Tel est le cas des pays de l'Est et du Centre de la France (chalets du Jura ou des Alpes, burons d'Auvergne).

Le type de fromage fabriqué — Cantal ou Gruyère, gros fromages de plusieurs dizaines de kilogs — se montre sensible aux variations que présente le lait dans son aptitude à la coagulation par la présure : dans certains « chalets » la teneur en eau du fromage au sortir de la presse est toujours un peu trop élevée, la pâte manque d'élasticité et tend à se fissurer au cours de la conservation. Ailleurs, au contraire, « l'égouttage » se fait facilement, la pâte est élastique et de bonne conservation.

(1) *fromage* vient du latin *forma*. En Auvergne, le fromage est appelé *fourme*,

On sait depuis longtemps que de telles différences de qualité entre les fromages peuvent être la conséquence de phénomènes bactériologiques, ou tenir à des variations dans la technique de fabrication (excès ou défaut d'ensemencement microbien du lait par des ferments lactiques convenables, variation dans les propriétés du lait en tant que milieu de culture pour les micro-organismes, durée respective des diverses phases de travail du caillé, température de chauffage, etc...).

La plupart des auteurs admettent que ces facteurs bactériologiques ou technologiques ont une influence *prépondérante* sur la qualité du fromage.

L'ensemble de nos propres observations poursuivies pendant plusieurs années dans différentes fromageries nous conduit à l'admettre avec eux, mais il nous a semblé également que l'aptitude du lait à la coagulation jouait un rôle qui était loin d'être négligeable. A l'appui de notre manière de voir nous avons remarqué :

a) le caractère *persistant et régulier* des différences constatées entre la qualité du fromage de deux ou plusieurs fromageries voisines qui s'oppose au caractère souvent passager, « accidentel », des défauts d'origine bactériologique qui surviennent brusquement et disparaissent après quelques jours ou quelques semaines pour réapparaître un peu plus tard.

b) d'autre part on constate souvent que les fromages diffèrent alors que l'examen bactériologique ne décèle pas de différences appréciables dans la flore microbienne des laits ou des fromages eux-mêmes et alors que le levain lactique utilisé est le même ;

c) quant à la technique de fabrication, son influence peut être éliminée si le même ouvrier fabrique les fromages de deux chalets voisins et surtout — comme cela a pu être réalisé dans quelques cas — si le lait de ces deux chalets, rassemblé le même jour au même endroit, est travaillé par le même fromager.

Or, ces conditions réunies, ne font pas disparaître les différences de qualité qui séparent les fromages de deux troupeaux, parfois éloignés seulement de 10 ou 20 kilomètres.

Nous ne décrirons pas ici plus en détail les observations faites à ce sujet : elles feront l'objet d'une autre publication, mais il était nécessaire de les exposer brièvement pour permettre de situer le présent travail et d'expliquer pourquoi nous l'avons entrepris, notre préoccupation principale étant l'étude des phénomènes de coagulation du lait en relation avec la fabrication et les propriétés du fromage.

Le but plus précis des recherches que nous rapportons maintenant est :

1. de déterminer s'il existe ou non un lien entre l'aptitude à la coagulation par la présure des laits individuels ou de « mélange » et leur composition chimique,

2^o de séparer le rôle de quelques-uns des principaux constituants du lait dans la formation d'un gel doué de propriétés caractéristiques.

PREMIÈRE PARTIE

I. — ÉTUDES DES VARIATIONS INDIVIDUELLES DANS L'APTITUDE A LA COAGULATION DU LAIT CHEZ LES VACHES LAITIÈRES

A) Prélèvement des échantillons

Nos essais ont porté, en majeure partie, sur des troupeaux de vaches de la race Pie Rouge (Est de la France) et de la race de Salers (Auvergne). Les échantillons de lait ont été prélevés à l'étable, sur la traite complète de chaque vache et dès la fin de la traite.

Les échantillons de lait de « mélange », destinés à servir de termes de comparaison, provenaient de la récolte du lait d'un troupeau de 100 à 200 vaches, la durée totale de traite du troupeau ne dépassant pas deux heures.

L'examen des laits était effectué aussitôt après la fin des prélèvements, sans séjour intermédiaire à la glacière.

B) Méthode d'examen

Pour mesurer le temps de coagulation nous avons suivi la technique de DAVIS et McCLEMONT (20) (« B. C. P. rennet test »), qui se prête bien à l'examen en série d'un grand nombre d'échantillons.

On mesure 10 cm³ de chacun des échantillons de lait qui sont placés dans des tubes au bain-marie à 35°. Chaque tube reçoit alors 1 cm³ d'une solution de présure d'un titre tel que la coagulation du lait de « mélange » servant de référence soit obtenue en 15-20 minutes. On utilise habituellement 0 cc 3 de présure liquide (extrait commercial) que l'on dilue à 100 cm³. L'addition de pourpre de bromocrésol (0,04 %) à la solution de présure permet le classement rapide des laits en trois catégories :

laits à pH moyen 6.6 — 6.8 ;

laits dits « alcalins » pH supérieur à 6.8 ;

laits « acides » pH inférieur à 6.6.

Dans beaucoup de cas le lait des animaux a été examiné, sur un prélèvement aseptique, pour déceler les infections microbiennes de la mamelle par les méthodes déjà décrites. (27).

C) Résultats

I. Proportion des laits « lents » et des laits de mammite

Lors d'une première investigation nous avons examiné le lait de 450 vaches de race Pie Rouge : 8 animaux (un peu moins de 2 % de l'effec-

tif du troupeau) produisaient un lait qui ne coagulait pas par la présure en trois heures à 35°, alors que la durée de coagulation d'un lait de « mélange » était dans les mêmes conditions de 15 à 20 minutes.

Dans ce groupe de 8 vaches, 3 présentaient une infection microbienne de la mamelle : l'ensemencement du lait sur gélose au sang montrait régulièrement la présence de staphylocoques pathogènes chez deux animaux et de *Streptococcus agalactiae* chez le troisième animal.

Les cinq autres vaches avaient une mamelle saine : le pH du lait et le taux des chlorures étaient normaux, l'examen bactériologique du lait ne révélait pas la présence de germes pathogènes.

Le lait de ces cinq vaches a été utilisé pour une partie des essais dont il sera question plus loin.

Au cours d'une deuxième investigation, plus étendue, qui a porté sur 8 856 vaches de race Pie rouge, on a trouvé 104 animaux dont le lait présentait les mêmes anomalies de coagulation que celles signalées plus haut. Dans cette deuxième investigation la distinction entre les deux types de lait — celui produit par des animaux à mamelle infectée et celui produit par des animaux apparemment sains — est basée simplement sur les résultats donnés par la mesure du pH (B. C. P. rennet test) et l'épreuve de Whiteside ; il ne s'agit donc que d'un classement approchée.

La proportion des animaux à lait incoagulable s'établit, en moyenne, autour de 1 à 2 % de l'effectif pour la race considérée (Pie rouge de l'Est).

Chez la race de Salers, qui est la plus répandue dans les montagnes d'Auvergne, la proportion des animaux produisant un lait coagulant mal par la présure est sensiblement plus élevée : sur un total de 297 animaux examinés, nous en avons trouvé 63 dont le lait ne coagulait pas par la présure.

Le *tableau I* résume ces observations.

TABLEAU I

Proportion des laits « lents » et des laits de mammite

	Race Pie-Rouge		Race de Salers	
	Nombre de vaches	%	Nombre de vaches	%
1° sur l'ensemble des vaches	8856	100	297	100
vaches donnant un lait « lent »	104	1,17	63	21
vaches donnant un lait de « mammite »	2347	26,5	—	—
2° sur les vaches donnant un lait « lent »	104	100	—	—
vaches donnant un lait de « mammite »	51	49	—	—

La proportion des animaux dont le lait présente à l'examen rapide les caractères d'un lait de mammite est plus élevée parmi ceux qui pro-

duisent un lait incoagulable (49 %) que pour l'ensemble du troupeau (26,5 %).

Cependant, dans la moitié seulement des cas, la coagulation défec-
tueuse du lait va de pair avec une infection microbienne apparente de la
mamelle ⁽¹⁾.

2. Différences dans l'aptitude à la coagulation du lait produit par les
différents quartiers de la mamelle d'une même vache

Chez les animaux à mamelle indemne d'infection microbienne, pré-
sentant un pH du lait et un taux de chlorures normaux, le temps de coagu-
lation du lait des quartiers séparés est voisin de celui du lait de la traite
totale.

TABLEAU II
*Variation de la durée de coagulation du lait de différents quartiers
chez une même vache*

Date	Vache	Lait de la traite totale		Lait de chaque quartier		
		Temps de ⁽²⁾ coagulation	pH	Quartier : ⁽¹⁾	Temps de coagulation ⁽²⁾	pH
2.9.48	L 11	250	6,81	AD	163	6,69
				PD	248	6,82
				AG	204	6,80
				PG	168	6,83
3.9.48	L 1	ne coagule pas	6,58	AD	ne coagule pas	—
				PD	»	—
				AG	»	—
				PG	»	—
3.9.48	L 14	270	6,67	AD	248	—
				PD	256	—
				AG	261	—
				PG	267	—
7.2.52	L 10	185	6,72	AD	188	—
				PD	177	—
				AG	182	—
				PG	183	—
2.9.48	L 12	181	6,77	AD	232	6,8
				PD	160	6,76
				AG	ne coagule pas	7,12
				PG	193	6,75
2.9.48	L 13	1780	6,85	AD	1290	6,79
				PD	ne coagule pas	6,90
				AG	548	6,78
				PG	1625	6,88

(1) AD = quartier antérieur droit AG = quartier antérieur gauche
PD = quartier postérieur droit PG = quartier postérieur gauche

(2) Temps de coagulation du lait de mélange = 100

⁽¹⁾ Au cours de ce travail nous avons attribué à la présence d'une infection microbienne, décelable par les tests bactériologiques usuels, la valeur d'un caractère différentiel, s'ajoutant à la liste de ceux que l'analyse chimique révélait entre plusieurs types de lait. Mais nous n'avons pas poussé plus loin les recherches bactériologiques et notre étude a été essentiellement orientée vers les aspects chimiques et physicochimiques de la coagulation du lait.

Par contre, chez les animaux atteints de mammite le temps de coagulation d'un quartier à l'autre est souvent variable.

Le tableau II montre les résultats de l'épreuve de coagulation par la présure effectuée sur le lait de chaque quartier de mamelle et sur le lait de la traite complète chez 6 vaches.

Pour 4 d'entre elles le temps de coagulation par la présure du lait des quartiers séparés et du lait de la traite complète est sensiblement le même.

Pour les deux autres vaches le lait de l'un des quartiers ne coagule pas du tout et c'est aussi celui dont le pH est le plus élevé et le résultat de l'examen bactériologique positif ; les autres coagulent au bout d'un temps variable d'un quartier à l'autre.

3. Variations observées au cours de la lactation et pendant plusieurs lactations successives

MCDOWALL et al. (2) ont observé, au cours de la lactation, une variation du temps de coagulation par la présure, variation orientée le plus souvent dans le sens d'un allongement progressif à mesure que la période de fin de lactation approchait. D'après PELTOLA (3), si l'on excepte le début et la fin de la lactation, les propriétés du lait, en ce qui regarde la coagulation, sont à peu près constantes.

Chez les animaux producteurs de lait « lent » que nous avons pu suivre à intervalles réguliers, les plus grandes difficultés de coagulation par la présure se situent pendant la période de pleine lactation. Au début et à la fin de la lactation, le lait coagule à nouveau dans un temps qui se rapproche de la normale.

En ce qui concerne les variations au cours de plusieurs lactations successives, deux vaches dont le lait a été étudié de 1948 à 1951 ont produit constamment un lait qui ne coagulait pas par la présure (sauf aux périodes de début et de fin de lactation). Pendant ce laps de temps l'examen bactériologique n'a pas permis de mettre en évidence une infection microbienne de la mamelle.

Le tableau III montre les résultats de l'épreuve de coagulation pour l'une d'elles, pendant 4 ans.

Au contraire, 3 autres vaches ont produit un lait « lent » pendant une ou deux lactations successives, puis un lait coagulant normalement au cours des lactations ultérieures. Ces modifications dans l'aptitude du lait à coaguler par la présure ne se sont pas traduites par des modifications dans l'état de santé apparent des animaux (1).

En ce qui regarde la productivité des animaux on trouve parmi les

(1) Nous remercions ici M. DENIS, vétérinaire à Sellières (Jura) qui a bien voulu examiner les animaux et nous faire part de ses observations.

vaches donnant un lait « lent » de bonnes laitières et d'autres qui ne fournissent qu'une faible quantité de lait.

TABLEAU III

*Variations dans la durée de coagulation du lait par la présure
au cours d'une lactation et d'une lactation à l'autre*

Epoque de la lactation	Vache L-10			
	1948	1949	1950	1951
1 ^{er} mois	—	—	—	147
2 ^{me} mois	—	—	—	168
3 ^{me} mois	—	—	—	200
4 ^{me} mois	—	180	254	—
5 ^{me} mois	—	—	420	pas de coagulation
6 ^{me} mois	pas de coagulation	—	242	
7 ^{me} mois	pas de coagulation	—	151	340
8 ^{me} mois	—	—	—	230
9 ^{me} mois	—	pas de coagulation	120	188
10 ^{me} mois	55		—	—
11 ^{me} mois	—	75	—	300
				120

La même observation peut d'ailleurs être faite chez des animaux producteurs de lait « rapide », c'est-à-dire de lait dont le temps de coagulation est plus court que la normale ; on rencontre également, parmi eux, des vaches qui produisent beaucoup et d'autres qui produisent peu de lait.

4. Variations du temps de coagulation observées sur un même échantillon de lait au cours de la conservation

LING (4) a déterminé la durée de coagulation d'un échantillon de lait avant et après séjour à la glacière, à $+ 7^{\circ}5$: il a constaté le plus souvent un allongement progressif du temps de coagulation (9 à 16 % du temps initial) après des temps de séjour au froid compris entre 3 heures et 27 heures.

Nos propres observations confirment celles de LING lorsque nous avons soumis à l'action de la présure des échantillons de lait de mélange avant et après conservation au froid. Par contre nous avons noté sur des échantillons de laits individuels des variations plus importantes : c'est ainsi que des échantillons de lait relativement « lents » coagulent en un temps deux ou trois fois supérieur à la durée de coagulation du lait de mélange, aussitôt après la traite, mais ne coagulent plus du tout, avec la même dose de présure, après 12 heures de séjour à la glacière (ce cas est le plus fréquemment observé).

Avec d'autres échantillons de laits lents par contre nous avons observé un comportement différent : la durée de coagulation reste à peu près

constante au cours de la conservation, ou bien elle devient plus courte, sans qu'un abaissement du pH résultant d'un développement microbien puisse être invoqué pour expliquer ce phénomène (*tableau IV*).

TABLEAU IV
Variations du temps de coagulation au cours de la conservation

Date	Age de l'échantillon	Lait « lent »			Lait de « mélange »	
		Échantillon	Temps de (1) coagulation	pH	Temps de (1) coagulation	pH
22.10.51	3 heures	L 8	29	6,78	22,7	6,73
	25 heures		36,5	6,78	23,3	6,73
7.1.52	8 heures	L 10	62	6,72	18,3	6,62
	26 heures		pas de coag.	6,73	19,5	6,66
	3 jours		pas de coag.	6,72	18,8	6,66
10.12.51	4 heures	L 10	41,7	6,51	14,3	6,62
	28 heures		45	—	14,8	—
	3 jours		44	6,72	13,5	6,62
17.7.51	18 heures	L 8	22	6,70	21	6,70
	25 heures		17,25	6,70	21,7	6,73
	48 heures		11,3	6,72	21,7	6,70

(1) Temps en minutes.

5. Comportement des laits « lents » vis-à-vis de la présure dans diverses conditions expérimentales

a) DOSES CROISSANTES DE PRÉSURE

Avec un lait de « mélange », on sait qu'il existe une relation de proportionnalité inverse entre la durée de coagulation et la dose de présure ajoutée (STORCH et SEGELKE (5)). Cette relation n'existe plus dans le cas des laits « lents » : en ajoutant une dose de présure suffisamment forte on peut obtenir leur coagulation, mais si l'on double ou triple cette dose on n'observe pas une diminution proportionnelle du temps de coagulation (*tableau V*).

TABLEAU V
Coagulation avec des doses croissantes de présure

Dose de présure en cc pour 10 cc de lait	Lait « lent » L-10	Lait de mélange
0,002 (× 1)	ne coagule pas	100
0,02 (× 10)	ne coagule pas	15
0,05 (× 25)	70	6,4
0,1 (× 50)	31	—
0,2 (× 100)	6,4	—

b) COAGULATION A DES TEMPÉRATURES DIFFÉRENTES

L'épreuve de coagulation par la présure est effectuée habituellement à 35°, mais la durée minimum de coagulation par une dose déterminée de présure s'observe vers 40-41°. A cette température la durée de coagulation est en moyenne 80 à 90 % de la durée de coagulation à 35°.

Dans le cas de laits « lents » les variations de la durée de coagulation sont parfois beaucoup plus marquées. Par exemple pour le lait « lent » L-10 (*tableau VI*) la durée de coagulation à 40° n'est plus que 17 % de la durée à 35°.

TABLEAU VI

Coagulation à 35° et à 40°

Echantillon de lait	pH	Dose de présure (en cc pour 10 cc de lait)	Temps de coagulation ⁽¹⁾		Temps de coagulation à 40° % du temps à 35°
			à 35°	à 40°	
« Mélange » n° 1	6,65	0,002	24	22	92
« Mélange » n° 2	6,62	0,004	15,5	13	83
« Lent » L 10	6,66	0,002	ne coagule pas	ne coagule pas	?
		0,03	ne coagule pas	3	?
		0,05	18	3	17

(1) En minutes.

II. — OBSERVATIONS SUR CERTAINES CARACTÉRISTIQUES ANALYTIQUES DES LAITS A COAGULATION DÉFECTUEUSE

Plusieurs travaux ont déjà été effectués sur la relation entre l'aptitude à la coagulation et la composition du lait. On doit citer notamment ceux de KOESTLER (1), VILEGHZANIN (6), HOSTETTLER et al. (7), PYNE (8), VAN DAM (9).

Nous donnons ici le résultat d'un certain nombre d'observations que nous avons pu faire sur le lait des vaches de race Pie Rouge en examinant parallèlement des laits individuels, « lents » ou « rapides », et des laits de « mélange » destinés à servir de terme de comparaison.

A) Méthodes d'analyse

SUBSTANCES AZOTÉES

Nous avons utilisé le mode opératoire proposé par ROWLAND (10) pour la détermination quantitative des différentes fractions azotées du lait (Azote total, caséine, albumine, globuline, protéose-peptone et azote non protéique).

Le dosage de l'ammoniaque, provenant de la minéralisation sulfurique (Kjeldahl) a d'abord été effectué avec des liqueurs de soude et d'acide sulfurique N/50, en prenant pour la titration finale les précautions indiquées par NICLOUX (11).

Par la suite, nous avons donné la préférence à la technique de titration de WAGNER, en utilisant l'acide borique selon le mode opératoire proposé par NAVELLIER (12).

CALCIUM

Le dosage du calcium dans le lait a été effectué sur le filtrat clair obtenu après précipitation par l'acide trichloracétique selon PYNE (13). Pour le dosage proprement dit, nous avons suivi la méthode de WASHBURN et SHEAR, adaptée au cas du lait par PYNE (14), mais nous avons opéré sur des quantités plus importantes que ce dernier auteur (prises d'essai renfermant 15 à 25 mg de Ca). Au lieu de centrifuger le précipité d'oxalate de calcium, nous l'avons séparé sur un filtre en verre poreux, la titration finale étant opérée avec une solution de MnO^4K N/10.

Dans certains cas (dosage sur le fromage ou sur un gel de paracéinate obtenu aussitôt après l'action de la présure), le produit a d'abord été calciné et le dosage conduit sur la solution des cendres.

PHOSPHORE

Les dosages ont été effectués par colorimétrie, selon BRIGGS (15) sur le produit de minéralisation sulfo-nitrique du lait (phosphore total), sur le filtrat trichloracétique (phosphore inorganique) et sur le filtrat trichloracétique, après minéralisation de ce dernier (phosphore inorganique + phosphore organique soluble).

Nous avons suivi les indications données par GRAHAM et KAY (16), LING (4), LANG et MIETHKE (17).

On doit veiller à ce que la concentration en acide sulfurique dans le milieu réactionnel où se produit la coloration, soit toujours la même. On utilise donc, suivant les cas, le réactif sulfo-molybdique, ou simplement — s'il s'agit d'un produit de minéralisation apportant une certaine quantité d'acide sulfurique — une solution de molybdate d'ammonium. Celle-ci doit être fraîchement préparée.

ACIDE CITRIQUE

Le dosage a été effectué sur le lait selon la méthode proposée par DE KADT et VAN MINNEN (18). On termine par la pesée du précipité de pentabromacétone.

MESURE DU PH

Nous avons utilisé l'électrode de verre et le potentiomètre de BECKMAN (modèle G).

B) Résultats

I. Substances azotées

a) SUBSTANCES AZOTÉES TOTALES

Comme la plupart des auteurs qui ont étudié cette question, nous n'avons pas trouvé de relation définie entre l'aptitude du lait à coaguler par la présure et sa teneur en azote (*tableaux VII et VIII*). On peut noter

TABLEAU VII
Répartition des différentes formes de l'azote

Date	Échantillon de lait	N total ‰ de lait	% de N total				
			N caséine	N albumine + N globuline	N globuline seul	N « protéose peptone »	N non protéique
22-12-48 ..	Lent L 1	5,33	79	—	2,6	—	—
18-1-49 ...	— L 1	5,34	—	—	2,02	—	—
12-5-49 ...	— L 1	5,69	76,6	14,5	—	2,8	6,05
24-5-49 ...	— L 1	5,50	75,2	14,1	—	3,34	7,05
22-12-48 ..	— L 3	5,81	85,2	—	2,84	—	—
18-1-49 ...	— L 3	5,80	—	—	2,03	—	—
30-12-49 ..	— L 3	6,24	81,9	—	—	—	5,04
20-11-51 ..	— L 5	7,04	80,8	—	—	—	4,5
8-11-51 ...	— L 8	6,4	78,8	—	—	6,06	4,0
24-5-49 ...	Rapide R 1	4,70	78,2	13,6	—	3,51	4,75
30-12-49 ..	— R 2	5,65	79	—	—	—	6,05
23-11-48 ..	Mélange B	5,16	79,7	—	3,92	—	—
18-1-49 ...	— B	5,03	—	—	2,86	—	—
29-11-48 ..	— M	5,12	80,6	—	3,01	—	—
26-2-51 ...	— J	5,03	78	—	—	—	6,42
14-12-51 ..	— D	5,2	78,7	13,5	—	3,87	3,96

TABLEAU VIII

Dates	N° de la vache	Durée de coagulation du lait	Laits		Lactosérums ⁽¹⁾		Phosphocaséinates ⁽¹⁾	
			Azote ‰	Ca/N	Azote ‰	Ca/N	Azote ‰	Ca/N
29-4-49	R 1	45	4,63	0,242	—	—	—	—
10-5-49	R 1	38	4,16	0,240	1,51	0,298	2,65	0,207
12-5-49	R 1	46	4,94	0,233	—	—	—	—
24-5-49	R 1	53	4,70	0,225	1,47	0,288	3,29	0,193
11-7-49	R 2	52	5,81	0,242	1,52	0,325	4,30	0,213
15-7-49	R 3	58	5,03	0,238	1,42	0,293	3,61	0,216
29-4-49	L 1	900	5,25	0,190	—	—	—	—
12-5-49	L 1	900	5,69	0,180	2,09	0,167	3,61	0,188
24-5-49	L 1	345	5,50	0,178	2,02	0,168	3,48	0,185
11-7-49	L 2	900	5,38	0,201	1,43	0,253	3,95	0,182
15-7-49	L 3	900	4,53	0,207	1,36	0,269	3,17	0,181
11-7-49	mélange	100	5,11	0,236	1,46	0,314	3,65	0,205
15-7-49	mélange	100	5,01	0,232	1,56	0,304	3,46	0,201

(1) Obtenus par supercentrifugation.

toutefois que les laits « lents » (non mammiteux) sont un peu plus nombreux parmi les échantillons qui ont une teneur en azote élevée : moyenne 5.60 et les laits « rapides » parmi ceux qui ont une teneur en azote faible : moyenne 4.98. La moyenne pour les laits « mélanges » examinés est 5.09.

b) CASÉINE

L'indice de caséine $\frac{N \text{ caséine}}{N \text{ total}}$ de ROWLAND (26) est généralement compris entre 79 et 81 % pour les échantillons de laits « lents » et « rapides » provenant d'animaux indemnes de mammite. C'est entre ces valeurs que se classent également la plupart des échantillons de lait à coagulation normale et provenant d'animaux sains, que nous avons eu l'occasion d'examiner dans la même région et chez la même race (Pie rouge de l'Est).

Nous avons noté d'autre part, la fixité relative de cette valeur du rapport chez un animal déterminé, pendant plusieurs lactations successives.

Au cours de nos essais nous avons observé chez un animal atteint de diarrhée une chute brusque de l'indice de caséine pendant quelques jours, sans que l'examen bactériologique du lait ait décelé d'infection de la mamelle (*tableau IX*). Malgré cette variation très notable de l'indice de caséine, la durée de coagulation est demeurée du même ordre : il s'agissait d'une vache produisant un lait « rapide ».

TABLEAU IX

Variations de l'indice de caséine, chez une vache atteinte de diarrhée (produisant un lait rapide)

Date	Temps de ⁽¹⁾ coagulation	Azote %	Indice de caséine	Observation
29 mars 1949	65	4,11	80,9	1 mois après le vêlage
29 avril »	51	4,63	—	2 mois après le vêlage
6 mai »				violente diarrhée, chute de la production
10 mai »	38	4,16	73,4	4 jours après la diarrhée, production redevenue presque normale
12 mai »	46	4,94	75,5	
25 mai »	53	4,70	78,2	
31 mars 1950	79	4,39	79,7	1 mois après le vêlage suivant

(¹) Temps de coagulation du lait de mélange = 100

Cet exemple semble montrer que l'indice de caséine peut varier dans d'assez larges limites sans entraîner, ipso facto, de changement important dans l'aptitude du lait à la coagulation.

c) SUBSTANCES AZOTÉES « SOLUBLES » ALBUMINE, GLOBULINE,
PROTÉOSE PEPTONE ET AZOTE NON PROTÉIQUE

D'après PORCHER (19) la globuline du lait exerce une action protectrice sur la caséine ; elle empêche ou tout au moins retarde la coagulation de celle-ci par la présure.

Nous avons dosé la globuline sur un certain nombre d'échantillons de laits « lents » non-mammiteux, en suivant la méthode proposée par ROWLAND et le *tableau VII* permet de faire la comparaison entre les valeurs ainsi trouvées et celles obtenues pour un lait de « mélange » prélevé en même temps.

La teneur en globuline est plus faible pour les laits « lents » que pour les laits de « mélange » ; il est donc peu probable que l'hypothèse de PORCHER puisse être retenue dans le cas des échantillons que nous avons examinés.

Quant aux autres fractions azotées : albumine, protéose-peptone, azote non protéique, leurs proportions respectives dans les laits « lents » sont du même ordre que dans les laits de « mélange ». Nos résultats ne font apparaître aucune valeur significative.

2. Les différentes formes de calcium et du phosphore dans le lait
en relation avec l'aptitude à la coagulation

a) CALCIUM ET PHOSPHORE TOTAUX DU LAIT

Considérée en valeur absolue, la teneur en calcium du lait ($\text{Ca } \text{‰}$ de lait) n'offre pas de relation bien significative avec l'aptitude à la coagulation : on observe des variations d'une vache à l'autre ou, — chez un même animal — à différentes périodes de la lactation et ces variations sont orientées, en gros, dans le même sens que celles des autres constituants du lait (graisse, caséine, etc...).

Mais étant donnée la relation qui existe entre le calcium et la caséine, principale substance azotée du lait, il était intéressant de considérer les variations du rapport calcium/azote (Ca/N) dans les divers échantillons de laits « lents », « rapides » et de « mélange » que nous avons à étudier.

Les résultats qui figurent dans le *tableau VIII* montrent que le rapport Ca/N est élevé pour les laits « rapides » et relativement bas pour les laits « lents ». Les laits de « mélange » occupent une position intermédiaire.

Sans qu'il soit possible de tracer une limite précise, on voit que pour la majorité des laits « lents », le rapport Ca/N est inférieur à 0,21 alors que pour les laits « rapides » Ca/N est égal ou supérieur à 0,23.

Là encore, l'observation s'applique aux laits « lents » provenant de mamelles saines.

Dans le cas des laits mammiteux, les résultats paraissent moins réguliers : DAVIS et McCLEMONT (20) ont déjà signalé une teneur en calcium anormalement basse dans les laits de mammite, toutefois, nous avons noté au moins un cas où une vache atteinte de mammite staphylococcique produisait un lait dont le rapport Ca/N atteignait 0,26, c'est-à-dire une des valeurs les plus élevées parmi toutes celles que nous avons trouvées.

La relation entre l'aptitude à la coagulation et la valeur du rapport Ca/N a été observée chez le même animal, au cours de plusieurs prélèvements successifs pendant la même lactation (*tableau X*) : à mesure que cette vache approchait de la fin de la lactation, on notait une élévation du rapport Ca/N et un raccourcissement simultané du temps de coagulation.

TABLEAU X

Lait de la vache L₁ vers la fin de la période de lactation

Dates : 1949	12 mai	24 mai	2 juin	6 juin
Durée de coagulation.....	ne coagule pas	345	127	97
Rapport Ca/N dans le lait.....	0,180	0,178	0,190	0,201

Comme dans le cas du calcium, on note que le rapport $\left(\frac{\text{phosphore}}{\text{azote}}\right)$ est en moyenne plus faible pour les laits « lents » que pour les laits « rapides » ou les laits de « mélange » mais la différence est moins marquée que dans le cas du calcium. Il s'ensuit que le rapport calcium/phosphore (Ca/P) présente, à son tour, une certaine relation avec l'aptitude du lait à la coagulation par la présure et varie dans le même sens que le rapport Ca/N : il est inférieur à 1,15 pour les laits « lents » et supérieur à 1,30 pour les laits « rapides ».

b) CALCIUM ET PHOSPHORE SOLUBLES

Ils ont été déterminés sur le sérum de supercentrifugation ou sur le sérum provenant de la coagulation du lait par la présure : nous décrirons plus loin, à propos des essais de supercentrifugation, les conditions d'obtention de ces deux sérums. Dans l'un et l'autre cas, on sait que les valeurs observées ne correspondent pas exactement à la teneur réelle en phosphore et calcium solubles, dialysables (PYNE (13), MATTICK (21)). En effet :

- a) Le sérum de supercentrifugation contient une certaine proportion (5 à 10 %) de caséine ;
- b) Le lactosérum provenant de la coagulation du lait par la présure

contient des substances azotées détachées de la caséine dont l'ensemble est connu sous le nom de protéose de HAMMARSTEN.

c) Enfin la coagulation par la présure s'accompagne de la fixation d'une partie du calcium et du phosphore solubles du lait sur le complexe (paraphosphocaséinate de calcium) (GRIMMER et PAAPE (22)).

Toutefois, il est possible de calculer une valeur approchée du calcium et du phosphore solubles à partir des données dont nous disposons en admettant que la caséine non sédimentée (après la centrifugation) ou non coagulée (après l'action de la présure) possède la même composition minérale que la fraction sédimentée ou coagulée. Ceci n'est sans doute pas tout à fait exact car HOSTETTLER et al. (7) ainsi que RAMSDELL et WHITTIER (23) ont montré dans le cas de la centrifugation que les fractions du phosphocaséinate les plus longues à se sédimenter, contenaient moins de phosphore et de calcium que les autres, mais la correction ainsi apportée n'intéresse qu'une faible proportion de la caséine et nous avons vérifié par le calcul qu'elle ne modifiait pas le sens des écarts observés entre lait « lent », lait « rapide » ou lait de « mélange ».

Le *tableau VIII* montre que le rapport Ca/N des sérums « lents » est plus faible que celui des sérums « rapides » ou « mélange ».

Le rapport P/N est assez variable et ne fait pas apparaître de relation nette avec l'aptitude à la coagulation du lait.

Une valeur intéressante à considérer est celle du rapport P inorganique soluble/Ca soluble. On voit, d'après les résultats du *tableau XI*, que cette valeur est toujours plus élevée pour les laits « lents » que pour les laits « rapides » ou « mélange », en d'autres termes il y a une relation inverse entre la valeur du rapport et l'aptitude à la coagulation.

TABLEAU XI

Valeurs du rapport : $\frac{P \text{ minéral soluble}}{Ca \text{ soluble}}$

Laits « lents »	Laits « rapides »	Laits « mélange »
0,904	0,611	—
1,085	0,711	0,750
1,105	0,934	—
1,220	0,750	—
1,250	0,835	—

N. B. Sur une même ligne figurent les résultats de prélèvements de lait effectués à la même date.

Ce résultat ne concorde pas avec les observations de LING (4) qui trouve au contraire une relation directe entre la valeur de ce même rapport et le temps de coagulation par la présure.

Nous ne disposons que d'un nombre limité de déterminations du rapport P inorganique soluble/Ca soluble, mais les résultats P soluble total/Ca soluble ⁽¹⁾. sont plus nombreux et font apparaître les mêmes différences entre les laits présentant des aptitudes variables à la coagulation.

c) CALCIUM ET PHOSPHORE INSOLUBLES

La quantité de calcium fixé par la caséine, ou lié au phosphore minéral colloïdal, est généralement plus faible pour les laits « lents » que pour les autres, mais la différence est moins marquée que pour le calcium soluble ou le calcium total du lait.

L'examen du rapport entre le phosphore organique de la caséine (phosphore lié à la sérine) et le phosphore colloïdal fait apparaître une autre différence entre les laits « lents » et les laits « rapides » ou « mélange ».

D'après les résultats dont nous disposons (*tableau XII*) les premiers ont une teneur en phosphore inorganique colloïdal plus basse que les seconds, par contre leur teneur en phosphore organique de la caséine est plus élevée. Le rapport $\frac{P_1}{P_2}$ entre la teneur en phosphore de la caséine (P_1) et la teneur en phosphore inorganique colloïdal (P_2) est régulièrement plus bas pour les laits « lents » que pour les laits « rapides ». Un seul lait rapide (R_3) fait en partie exception à la règle : sa teneur en phosphore

TABLEAU XII

*Relation entre le phosphore organique insoluble (P de la caséine)
et le phosphore inorganique insoluble (P minéral colloïdal)*

Dates	Lait	Phosphore de la caséine P_1	Phosphore minéral colloïdal P_2	$\frac{P_1}{P_2} \times 100$	Temps de coagulation
25-2-50	Lent L 6	0,835	0,784	106	ne coagule pas
15-7-49	— L 3	0,935	0,912	102,3	— d°
11-7-49	— L 2	0,837	0,870	96,3	— d°
24-5-49	— L 1	0,895	0,962	93	245
	Moyennes	0,875	0,882		
11-7-49	Mélange	0,863	0,978	88,7	100
24-5-49	Rapide R 1	0,770	1,01	76,2	53
11-7-49	— R 2	0,760	1,19	63,8	52
10-5-49	— R 1	0,775	1,22	63,5	38
25-2-50	— R 3	0,903	1,55	58,6	49
15-7-49	— R 3	0,719	1,375	52,2	57
	Moyennes	0,785	1,268		

organique est en effet élevée (0,903), du même ordre que celle des laits « lents », mais sa teneur en phosphore inorganique colloïdal est également

⁽¹⁾ dans lequel :

P soluble total = P inorganique soluble + P organique soluble.

très forte de sorte qu'il se classe — au point de vue de la valeur du rapport $\frac{P_1}{P_2}$ — dans la même catégorie que les laits « rapides ».

De l'ensemble de ces observations, on peut conclure que les laits « lents » contiennent relativement peu de calcium total (soluble ou insoluble), peu de phosphore minéral (soluble ou insoluble), mais leur teneur en phosphore organique est en moyenne légèrement supérieure à celle des laits « rapides » ou de « mélange ».

3. pH et acide citrique

a) pH

La différence entre le pH des laits « lents » (provenant d'animaux à mamelle saine) et celui des laits « rapides » est faible. Le pH du lait « lent » est en moyenne à peine plus élevé que celui du lait « rapide » (*tableau XIII*).

TABLEAU XIII

pH de différents échantillons de lait

Laits « lents »		Laits « rapides »		Laits de mélange	
	pH		pH		pH
A 1	6,69	R 1	6,64	M 1	6,76
—	6,59	—	6,65	—	6,62
—	6,30	—	6,60	—	6,64
—	6,69	—	6,30	M 2	6,85
A 2	6,45	R 2	6,50	M 3	6,55
A 3	6,61	R 3	6,45	M 4	6,71
—	6,65	R 4	6,52		
—	6,67	R 5	6,62		
A 7	6,55	R 6	6,64		
A 16	6,72				
A 17	6,68				
Moyenne	6,61		6,55		6,69

On sait par contre que le lait provenant d'animaux atteints de mammite présente une valeur supérieure à la valeur moyenne normale, elle peut atteindre et dépasser pH 7,00.

b) ACIDE CITRIQUE

LING (4) a émis l'hypothèse que le rapport acide citrique/calcium influence la coagulation par la présure. Une dose plus forte de citrate di ou tribasique dans le lait retarderait sa coagulation.

Le *tableau XIV* donne les teneurs en acide citrique de trois laits « lents » — deux provenant d'animaux à mamelle saine, le troisième

d'une vache infectée par des staphylocoques — de deux laits de « mélange » et d'un lait « rapide ».

TABLEAU XIV
Teneurs en acide citrique

Échantillon de lait	Temps de coagulation	Acide citrique, ‰ de lait	Observations
« lent » L 1.....	ne coagule pas	1,192	mamelle saine
« lent » L 3.....	365	1,200	mamelle saine
« lent » L 15.....	222	1,690	mamelle infectée
« rapide » R 4.....	55	1,360	mamelle saine
« mélange » B 1.....	100	1,830	
« mélange » B 2.....	100	1,720	

La teneur en acide citrique des laits « lents » est plus basse que celle des laits de « mélange », et il ne semble pas, d'après ces premiers résultats, que l'on puisse attribuer le défaut de coagulation à une teneur plus forte en acide citrique ou citrate.

DEUXIÈME PARTIE

I. — INFLUENCE RESPECTIVE DES CONSTITUANTS SOLUBLES ET DES CONSTITUANTS INSOLUBLES SUR LE COMPORTEMENT DU LAIT VIS-A-VIS DE LA PRÉSURE

Après avoir, dans la première partie de notre travail, déterminé les caractères principaux et la composition de laits présentant une aptitude variable vis-à-vis de la coagulation par la présure nous avons cherché à définir le rôle des différents constituants solubles et insolubles qui interviennent dans le phénomène.

Il était nécessaire de séparer tout d'abord ces constituants : nous avons essayé d'obtenir cette séparation par un procédé introduisant le minimum de changements dans la structure colloïdale du lait et nous avons fait appel à la centrifugation, déjà utilisée par plusieurs chercheurs (DE KADT et VAN MINNEN (18), RAMSDELL et WHITTIER (23), HOSTETTLER et al. (7)), pour obtenir le phosphocaséinate de calcium à l'état natif.

A. — Technique de la centrifugation

1. Fonctionnement de l'appareil

L'appareil utilisé était une supercentrifugeuse « Sharples », mue par une turbine à air comprimé permettant d'atteindre la vitesse de

50 000 tours par minute. Le lait écrémé et préalablement refroidi à une température comprise entre $+ 2^{\circ}$ et $+ 5^{\circ}$ était centrifugé dans un bol clos, en métal Monel, d'une capacité d'environ 300 cm³. Dans la plupart de nos essais, le bol était complètement rempli de lait : le poids du lait étant déterminé par pesée du bol sur un trébuchet spécial avant et après remplissage (le bol pèse environ 2 kg et la précision de la pesée est $\pm 0,05$ g).

Lors des premiers essais, la supercentrifuge ne comportait pas de dispositif de refroidissement du bol : après une heure de fonctionnement à 30-40 000 tours par minute, la température du liquide contenu dans le bol s'élevait à 24-35°, suivant la température de la pièce où l'appareil se trouvait placé. Nous avons remarqué que cet échauffement entraînait certaines altérations dans les propriétés du sédiment (phosphocaséinate) recueilli sur la paroi du bol à la fin de l'opération.

Aussi l'appareil a-t-il été muni d'un serpentín en cuivre entourant le bol, et parcouru par un courant d'eau glacée : la goulotte supérieure coiffant le carter de la centrifuge était elle-même refroidie par de l'eau glacée. Dans ces conditions la température du liquide ne dépasse pas 19° à 50 000 tours/minute et 17° à 40 000 tours/minute, après 1 heure de centrifugation.

2. Récolte des produits centrifugés

a) EN VUE DE LEUR ÉTUDE ANALYTIQUE

Après ouverture du bol, on verse doucement le lactosérum que l'on recueille dans un flacon. A la surface du lactosérum se trouve généralement rassemblée une petite quantité de graisse qui n'a pas été enlevée par le premier écrémage : on l'élimine par filtration sur papier ou laine de verre.

Le bol vide est alors égoutté, pendant 30 secondes exactement, dans la position renversée de manière à ce que les conditions de récolte des deux phases (phase liquide et phase sédimentée) soient comparables d'un essai à l'autre. Le bol est pesé à nouveau sur le trébuchet et l'on obtient par différence avec le poids du bol vide et sec, le poids total du sédiment P, généralement voisin de 30 g (apprécié à $\pm 0,05$ g près).

Le sédiment déposé sur la paroi du bol ne présente pas un aspect homogène : à la partie inférieure il est relativement sec et opaque tandis qu'à la partie supérieure du bol il est plus humide et plus transparent. On recueille le sédiment en le détachant de la paroi du bol avec une spatule et on le transvase dans un pèse-filtre taré que l'on pèse ensuite à la balance de précision (Poids P'). Une petite partie de ce sédiment reste attachée à la paroi du bol, mais on peut admettre que sa composition est semblable à celle de la partie récoltée. On effectue ensuite une homogénéisation de ce sédiment dans l'eau distillée froide, de façon à pouvoir

prélever des parties aliquotes pour les diverses analyses. Le sédiment est transvasé quantitativement du pèse-filtre dans le récipient d'un appareil « Turmix » avec environ 250 cm³ d'eau distillée, 2 minutes d'agitation à 12.000 tours/minute donnent une suspension homogène. On fait tomber la mousse avec 4 gouttes d'alcool octylique et l'on amène le volume à 500 cm³ dans une fiole jaugée.

Ce mode opératoire nous a paru le meilleur, car il permet de rapporter avec précision les résultats analytiques à un poids déterminé de sédiment (P') et avec une approximation suffisante à la totalité du sédiment (P) et au poids de lait mis en œuvre.

b) EN VUE DE LA RECONSTITUTION DE LAITS « MIXTES »

Nous avons désigné sous ce terme les produits obtenus en mettant en suspension le phosphocaseinate (sédiment) d'un lait, provenant d'un premier échantillon (A), dans le lactosérum de supercentrifugation d'un autre échantillon de lait (B). Le mode opératoire est analogue au précédent sauf que le sédiment est remis en suspension en le mélangeant avec le lactosérum de supercentrifugation et non avec de l'eau distillée ; le sédiment est transvasé directement du bol dans le récipient en verre du « Turmix », qui contient déjà le lactosérum préalablement refroidi au voisinage de 0°. Ce refroidissement est destiné à réduire les risques d'altération du sédiment par suite d'une élévation de température au cours du mélange dans le « Turmix » ; dans nos essais la température à la fin du mélange ne dépassait pas 20°. Nous avons utilisé dans quelques cas, au lieu du « Turmix », un homogénéisateur (Emulgor Gann) qui force le liquide à passer par un orifice étroit. Cet appareil permet également une très bonne homogénéisation du sédiment dans le lactosérum.

3. Remarques sur la mise en suspension des sédiments obtenus sur la paroi du bol

En suivant la technique décrite ci-dessus, nous avons obtenu dans la grande majorité des cas une mise en suspension très facile du sédiment dans le sérum. Le nouveau « lait » résultant du mélange de ces deux constituants se montre aussi stable que le lait primitif, et l'on ne constate pas, plusieurs heures ou même plusieurs jours après l'opération, de dépôt appréciable dans le fond des récipients.

Cependant il nous est arrivé d'observer, après passage au « turmix », des suspensions imparfaites : les unes donnent assez lentement un dépôt fin, les autres donnent rapidement un dépôt granuleux que l'on ne parvient pas à réémulsionner.

Ceci se produit souvent lorsque, pendant les opérations de centrifugation et de mélange au « turmix », la température atteint ou dépasse 25°.

Il est donc important de refroidir le plus possible la centrifugeuse et le « turmix » ainsi que les produits (lait, sérum, sédiment).

La vitesse de centrifugation exerce également une influence. Nous avons observé que le mélange du sédiment et du lactosérum se faisait mieux lorsque la vitesse ne dépasse pas 40 000 tours par minute. A 50 000 tours/minute le dépôt est parfois difficile à remettre en suspension.

Avec certains échantillons de lait, il semble que les difficultés d'obtention d'une suspension homogène et stable proviennent des constituants eux-mêmes : sédiment et lactosérum. Le lait L 8 par exemple, centrifugé à 50 000 ou 40 000 tours/minute donnait après passage au « turmix », un dépôt abondant. En abaissant la vitesse de centrifugation à 20 000 tours/minute nous sommes parvenus à obtenir un sédiment qui donnait une suspension homogène.

4. Influence de la centrifugation et de l'homogénéisation sur le temps de coagulation du lait par la présure

Le lactosérum et le sédiment provenant de la centrifugation d'un même lait ont été mélangés à l'aide du « turmix » suivant la technique décrite ci-dessus et l'on a comparé le temps de coagulation par la présure de ce nouveau « lait » à celui du lait primitif. Les résultats, rapportés dans le *tableau XV*, montrent que l'ensemble des manipulations effectuées sur un même échantillon de lait ne modifie pas de façon sensible le temps de coagulation par la présure, même lorsque la mise en suspension du sédi-

TABLEAU XV

Influence de la supercentrifugation et de l'homogénéisation sur le temps de coagulation du lait reconstitué

Échantillon	Supercentrifugation		Reconstitution au « Turmix »		Temps de coagulation du lait reconstitué (lait original = 100)
	Vitesse (t/min.)	Température finale	Température finale	homogénéité du mélange	
« Mélange » {	1. 40 000	14°5	22°	homogène	109,5
	2. 50 000	16°5	23°	très hétérogène	111,5
« Mélange »	40 000	14°	18°5	homogène	107
« Mélange »	30 000	32°5		hétérogène	117
« Lent » L6 {	1. 20 000	11°	19°5	hétérogène	109
	2. 40 000	12°	17°	homogène	116 (1)
			19°	homogène	101 (2)
« Mélange » {	(Sédiment reconstitué dans la totalité du sérum séparé)				
	1. 40 000	13°	19°	homogène	113
« Mélange » {	(Sédiment reconstitué dans la moitié du sérum séparé)				
	2. 40 000	16°	19°	homogène	109

(1) au « Turmix »

(2) à l'émulgor « Gann »

ment est imparfaite. L'allongement du temps de coagulation est en moyenne de 10 % (soit 100 à 110), ce qui est peu si l'on observe que les différences entre laits « lents » et laits « rapides » sont de l'ordre de 100 à 1 000 et parfois davantage.

On notera également que les proportions relatives de sédiment et de lactosérum mélangés pour former un lait « mixte » semblent pouvoir varier dans de larges limites sans influencer sur le temps de coagulation. Le dernier essai du *tableau XV* en donne un exemple : le lait « mixte », deux fois plus concentré en phosphocaséinate, coagule dans le même temps que le lait « mixte » de composition normale.

5. Fidélité de la technique employée

Des essais en doubles, effectués dans des conditions identiques sur le même lait avec des durées de supercentrifugation de 5 minutes ou de 1 heure, ont permis d'obtenir des chiffres concordants en ce qui concerne les résultats analytiques (*tableau XVI*).

TABLEAU XVI

Fidélité de la technique de supercentrifugation

	Lait rapide (R 3)		Lait de mélange	
	(Centrifugation 1 heure à 50 000 tours)		(Centrifugation 5 minu- tes à 50 000 tours)	
	1 ^{er} essai	2 ^{me} essai	1 ^{er} essai	2 ^{me} essai
Poids de sédiment 0/00 de lait.....	119,3	119	72,4	74,1
Extrait sec du sédiment.....	33,9	33,3	26,2	26,18
Poids sec sédimenté pour 0/00 de lait.....	40,5	39,6	19	19,37
N total (0/00 de lait).....	4,97	4,955		
Ca total ».....	1,227	1,215		
P total ».....	0,757	0,745		

B) Application de la méthode au cas des laits « lents » et « rapides »

Nous avons pris comme matériel d'expérience plusieurs échantillons de lait dont les uns coagulaient lentement, les autres rapidement sous l'action de la présure, une troisième catégorie étant représentée par des laits de « mélange » coagulant avec une vitesse moyenne.

1. Prélèvement et conservation des échantillons de lait

Toutes les opérations de traite et de prélèvement ont été conduites avec propreté de façon à réduire, dans la mesure du possible, les contaminations microbiennes.

Moins d'une heure après, les prélèvements étaient rassemblés au

laboratoire, filtrés sur coton et écrémés dans une petite écrémeuse centrifuge. Chaque échantillon était alors additionné de toluène (0,5 cc par litre), refroidi à $+ 4^{\circ}$ et conservé à cette température pendant la durée des essais.

Ces derniers ont été, le plus souvent, effectués dans les 18 heures qui suivaient la traite. Quelques-uns ont été plus longs et nous l'avons alors signalé dans le texte. Cependant nous avons vérifié, par des numérations sur gélose nutritive, que la population microbienne du lait — peu nombreuse au départ étant donné les précautions élémentaires de propreté prises pour la récolte (moins de 20 000 germes par cm^3 dans les laits individuels, moins de 100 000 germes par cm^3 dans les laits de mélange) — restait stable. La présence de toluène et le maintien à basse température suffisent pour obtenir ce résultat.

2. Détermination de la durée de coagulation par la présure

Au cours des essais portant sur la comparaison des durées de coagulation des échantillons de laits « lents », « rapides » ou « mélange » spécialement choisis, nous avons employé le procédé déjà mentionné (20), mais en répétant l'épreuve avec des solutions de présure de plus en plus diluées de façon à obtenir, par exemple, la coagulation du même échantillon de lait de « mélange » dans des temps de 10, 15, 20 minutes, dont on calculait ensuite la moyenne. Les résultats donnés par les divers échantillons de lait sont exprimés en pour cent de la valeur obtenue pour le lait de « mélange ».

Nous avons préparé les laits que nous désignons sous le nom de « laits mixtes » et qui correspondent aux formules suivantes :

1. — Sédiment de lait « lent » + lactosérum de lait « rapide » ou de « mélange ».

2. — Lactosérum de lait « lent » + sédiment de lait « rapide » ou de « mélange ».

3. — Quelques préparations de laits mixtes, obtenus à partir de laits « rapides » et de laits de « mélange », ont été également soumises à l'action de la présure.

Dans sept expériences successives on a mis chaque fois en œuvre deux laits : un lait « lent » et un lait « rapide » ou bien un lait « lent » et un lait de « mélange », à partir desquels on a préparé les deux laits mixtes possibles selon les formules 1 et 2 (chaque composant d'un lait, sédiment ou lactosérum, se trouvant combiné avec le composant complémentaire de l'autre lait). C'est ce que nous avons désigné sous le nom de « reconstitution croisée ».

En comparant l'aptitude à la coagulation de ces laits « mixtes » à celle des laits qui ont servi à les préparer, on peut juger de l'influence respective des deux composants sur le phénomène de coagulation.

3. Résultats

Les résultats sont reportés dans le *tableau XVII*.

Le temps de coagulation des laits « lents » et « rapides » est exprimé en prenant, pour chaque série d'essais, la durée de coagulation du lait de mélange égale à 100.

Le temps de coagulation d'un lait « mixte » est, dans la plupart des cas, compris entre les temps de coagulation des laits qui ont servi à le préparer.

Dans l'ensemble, l'influence du lactosérum sur la durée de coagulation est plus marquée que celle du phosphocaséinate.

TABLEAU XVII
Coagulation des laits « mixtes »

Date	Composition du lait « mixte »	Temps de coagulation			
		Lait « mixte »	Lait « lent »	Lait « rapide »	Lait de mélange
1° Lait « mixte » : « lent » + « mélange »					
N° 1	phospho. L-1 + sérum M-1	190	345	—	100
2	phospho. L-2 + sérum M-2	212	pas coagul.	—	100
3	phospho. L-3 + sérum M-3	418	pas coagul.	—	100
4	{ phospho. L-4 + sérum M-4	170	{ pas coagul.	—	100
	{ phospho. M-4 + sérum L-4	237			
5	{ phospho. L-5 + sérum M-5	146	{ pas coagul.	—	100
	{ phospho. M-5 + sérum L-5	pas coagul.			
6	{ phospho. L-10 + sérum M-6	202	{ 291	—	100
	{ phospho. M-6 + sérum L-10	203			
7	{ phospho. L-10 + sérum M-7	210	{ 338	—	100
	{ phospho. M-7 + sérum L-10	212			
8	{ phospho. L-7 (1) + sérum M-8	pas coagul.	{ pas coagul.	—	100
	{ phospho. M-8 + sérum L-7 (1)	715			
2° Lait « mixte » : « lent » + « rapide »					
9	{ phospho. L-1 + sérum R-1	55	{ pas coagul.	45	—
	{ phospho. R-1 + sérum L-1	94			
10	{ phospho. L-1 + sérum R-1	47	{ pas coagul.	45	—
	{ phospho. R-1 + sérum L-1	89			
3° Lait « mixte » : « rapide » + « mélange »					
11	phospho. R-1 + sérum M-1	99	—	53	100
12	phospho. R-2 + sérum M-2	76	—	52	100
13	phospho. R-3 + sérum M-3	91	—	58	100
14	phospho. M-8 + sérum R-4	79	—	70	100

(1) lait de mammité.
(2) Les sédiments sont lavés à l'eau distillée avant la « reconstitution ».

Ce résultat apparaît dans quatre essais de reconstitution « croisée » (essais n° 4, 5, 9 et 10). On voit que les laits « mixtes » de formule 2, contenant les lactosérums « lents » L 1, L 4, L 5, ont un temps de coagulation plus long que les laits « mixtes » de formule 1 dans lesquels figurent les sédiments « lents ».

Pour L 5 notamment l'influence du lactosérum « lent » est dominante : le lait « mixte » ne coagule pas. L'influence du sédiment « lent » est plus faible : le lait « mixte » coagule en un temps assez voisin de celui du lait de « mélange » (146 au lieu de 100).

Pour L 10, par contre, l'influence du sédiment et celle du lactosérum sont sensiblement équivalentes : les deux laits « mixtes » coagulent dans des temps voisins et intermédiaires entre la durée de coagulation du lait de « mélange » (100) et celle du lait « lent » (291-338).

Si l'on considère l'influence des constituants des laits « rapides », (recombinés avec les constituants de laits « lents »), on voit que l'influence du sérum est encore dominante. Le temps de coagulation des laits « mixtes » : sérum R + phospho L est très voisin de celui du lait « rapide ». La durée de coagulation du lait mixte : sérum L + phospho R est presque double de celle du lait rapide.

Enfin dans le cas des laits « mixtes » obtenus en combinant les constituants d'un lait « rapide » et d'un lait de « mélange », les résultats font apparaître à nouveau l'influence du sédiment et celle du lactosérum, cette dernière étant la plus marquée.

L'ensemble de ces observations amène donc à conclure que le comportement d'un lait vis-à-vis de la présure dépend à la fois de la composition de la fraction soluble (lactosérum) et de celle de la fraction insoluble (phosphocaseinate de calcium).

Si l'influence du lactosérum est la plus marquée, elle n'est cependant pas suffisante — dans la grande majorité des cas — pour qu'un phosphocaseinate « lent » mis en suspension dans un lactosérum de lait de « mélange » coagule au bout du même temps que ce lait de « mélange », ou bien — inversement — pour qu'un phosphocaseinate « mélange » prenne, lorsqu'il est reconstitué dans un lactosérum « lent », le même caractère de non coagulation par la présure que possède le lait « lent ».

L'influence du sédiment est donc évidente. Si elle est en général plus faible que celle du lactosérum elle est cependant constante dans tous les essais où le lait « mixte » résulte de la combinaison des constituants d'un lait « lent » avec ceux d'un lait de « mélange ».

Ce sont les différences existant entre plusieurs laits au niveau du complexe phosphocaseinate de calcium qui se révèlent dans la pratique, lors de la fabrication du fromage. La composition du fromage est en effet voisine de celle du sédiment obtenu par centrifugation.

REMARQUE.

Le sédiment, déposé sur la paroi du bol après la centrifugation, contient une certaine quantité de lactosérum et cette quantité est d'autant plus grande que la teneur en eau du sédiment est elle-même plus élevée.

Toutefois l'influence de ce sérum sur le temps de coagulation du lait « mixte » préparé ultérieurement paraît faible : des essais effectués avec ou sans lavage du sédiment par l'eau bi-distillée (deux lavages, avec chaque fois 300 cm³ d'eau correspondant au volume initial du lait et centrifugation après chaque lavage) nous ont donné des résultats comparables à ceux obtenus avec le sédiment non lavé.

CAS DES LAITS DE MAMMITE

Le lait L 7 est un lait « lent » provenant d'une vache atteinte de mammite streptococcique. Son indice de caséine est de 68,9. Le lait « mixte » résultant de la combinaison du sédiment L 7 avec le lactosérum du lait de « mélange » ne coagule pas, alors que le lait « mixte » inverse (sédiment « mélange » + lactosérum L 7), coagule (715).

L'influence du phosphocaséinate est donc ici *plus marquée* que celle du lactosérum.

Dans le but d'obtenir la coagulation du lait « mixte » préparé avec le sédiment L 7 nous avons fait subir à ce sédiment le traitement suivant :

1^o deux lavages à l'eau distillée,

2^o deux lavages avec du lactosérum provenant de la centrifugation d'un lait de mélange.

La suite des opérations s'établit ainsi :

a) Supercentrifugation du lait L 7 pendant 1 heure à 50 000 tours/minute. On obtient un premier sédiment S 1 et un lactosérum L 1.

b) S 1 est dispersé, au « turmix », dans un volume d'eau distillée égal à celui du lactosérum L 1, puis centrifugé à nouveau pendant 1 heure à 50 000 tours/minute. On obtient un deuxième sédiment S 2.

c) On répète sur S 2 la même opération que sur S 1 et l'on obtient un troisième sédiment S 3.

d) Le sédiment S 3 est dispersé dans le lactosérum provenant de la supercentrifugation d'un lait de « mélange ». Le lait « mixte » obtenu est conservé pendant une nuit à la glacière, puis centrifugé à nouveau (1 heure à 50 000 tours/minute), obtention d'un quatrième sédiment S 4.

e) Le sédiment S 4 est dispersé à nouveau dans une nouvelle portion de lactosérum provenant de la supercentrifugation du lait de « mélange ».

Le lait « mixte » ainsi préparé, de même que le lait « mixte » obtenu avec le sédiment brut (non lavé), n'a pas coagulé sous l'action de la présure.

On peut donc admettre que le défaut de coagulation de ce lait est lié à la composition particulière de son phosphocaséinate.

II. — RELATION ENTRE L'APTITUDE DU LAIT A COAGULER PAR LA PRÉSURE ET LES CARACTÈRES DES SÉDIMENTS ET LACTOSÉRUMS OBTENUS PAR SUPERCENTRIFUGATION

1^o Aspect des sédiments et des lactosérums

Après 1 heure de supercentrifugation, à 30 000 ou 50 000 tours/minute, le sédiment des laits de « mélange » se présente sous forme d'une gelée translucide, surtout dans la partie supérieure du bol. Ce gel est assez ferme, il se détache aisément du bol avec la spatule sous forme d'un film d'environ 2 millimètres d'épaisseur.

Le sédiment des laits « lents », obtenu dans les mêmes conditions, est constitué par une gelée molle, plus transparente que la précédente et d'épaisseur souvent plus grande. Cette gelée s'amasse sur la spatule, sans conserver la forme qu'elle avait sur la paroi du bol.

Toutefois un sédiment « lent », celui du lait L₁, a présenté un autre aspect : il forme sur la paroi du bol un dépôt blanc opaque et plutôt cassant au moment de la récolte sur la spatule. Sa teneur en eau est, toutes conditions égales, plus faible que celle des autres sédiments lents.

Le lactosérum obtenu après une heure de centrifugation à 50 000 tours/minute est plus clair dans le cas des laits « rapides » que dans celui des laits « lents ».

2^o Teneur en eau

MÉTHODE. — Une fraction aliquote (30 cm³) de la suspension de sédiment, préparée comme il a été décrit plus haut est d'abord évaporée au bain-marie bouillant puis desséchée sous vide à 80° jusqu'à poids constant.

RÉSULTATS. — Les conditions de la supercentrifugation étant identiques, au point de vue de la vitesse, de la température et de la durée, on observe que les sédiments provenant de laits « lents » ont, en règle générale, une teneur en eau plus élevée que ceux provenant de laits « rapides » ou de laits de « mélange ».

Sur 17 essais comparatifs, un seul fait exception à ce qui vient d'être dit (l'essai du 31 mars 1950). La différence de teneur en eau existe aussi bien pour les durées de centrifugation longues (1 heure) que pour les durées de centrifugation courtes (5 minutes). (*Tableaux n° XVIII et XIX*).

TABLEAU XVIII

Teneur en eau des sédiments obtenus après 1 heure de centrifugation

Dates	Laits lents		Laits rapides		supercentrifugation	
	N° de la vache	Teneur en eau % du sédiment	N° de la vache	Teneur en eau % du sédiment	Température à la fin de la centrifugation	Vitesse de centrifugation (tours/min.)
15 juillet 1949.....	L ₃	74,9	R ₃	73,6	15°5	30 000
27 juillet 1949.....	L ₃	74,4	R ₃	73,0	18°	30 000
24 mai 1949	L ₁	67,5	R ₁	66,4	28°5	30 000
11 juillet 1949.....	L ₂	69,3	R ₂	65,3	34°5	30 000
30 décembre 1949	L ₃	72,6	R ₂	68,4	17°	50 000
31 mars 1950	L ₁	64,7	R ₁	66,5	20°	50 000
25 février 1950	L ₄	72,2	R ₃	66,7	24°5	50 000
7 décembre 1950	L ₁₀	71,6	R ₃	69,9	18°	50 000
10 décembre 1951	L ₁₀	74,9	M _j	71,4	15°	40 000
7 janvier 1952.....	L ₁₀	73,3	M _j	70,8	12°5	40 000

TABLEAU XIX

Teneur en eau des sédiments obtenus après 5 minutes et après 1 heure de centrifugation

Date	Laits « lents »		Laits « rapides »		Supercentrifugation		
	Echantillon	Teneur en eau % du sédiment	Echantillon	Teneur en eau % du sédiment	Durée	Température finale	Vitesse (tours/min.)
7.7.50	L 16	75,2	R 5	73,1	5 min.	21°	50 000
		68,8		66,9	1 h.	18°	50 000
5.8.50	L 17	75,4	R 17	73,7	5 min.	20°	50 000
		69		67,4	1 h.	20°	50 000

3. Comparaison entre la teneur en eau du paracaséinate et celle du phosphocaséinate.

Il nous a paru intéressant de rechercher si les différences d'affinité pour l'eau, observées sur les sédiments de laits « lents » et « rapides », étaient de même sens et de même amplitude pour les gels de paracaséinate résultant de la coagulation par la présure de ces laits « lents » et « rapides ».

MODE OPÉRATOIRE. — Nous avons préparé des gels « égouttés » de paracaséinate dans des conditions aussi semblables que possible en utilisant la technique suivante :

Le bol de la supercentrifugeuse est rempli de lait et placé dans un bain-marie à 35° ; lorsque le lait a lui-même atteint la température de 35°, on ajoute la dose de présure nécessaire pour obtenir la coagulation en

10-15 minutes. (Cette dose est évidemment plus forte pour les laits « lents » que pour les laits « rapides »). Après l'apparition des premiers flocons, on laisse durcir le gel pendant 5 minutes, puis le bol est fermé et accouplé à la supercentrifugeuse. La supercentrifugation a été effectuée aux mêmes vitesses que dans les essais précédents, mais pendant un temps variant de 3 à 5 minutes.

Après égouttage du bol (30 secondes) dans la position renversée, le paracaséinate forme un enduit blanc porcelaine qui tapisse la paroi interne du bol de façon très régulière ; on le détache comme une feuille de papier à l'aide de la spatule. Après découpage rapide et mélange des fragments, il est facile de prélever des parties aliquotes du coagulum pour les différentes déterminations analytiques. L'expérience a montré que l'on pouvait, en suivant la technique décrite ci-dessus, obtenir des résultats bien reproductibles.

Cette technique ne fait d'ailleurs qu'adapter à l'échelle du laboratoire le procédé suivi par le fromager qui sépare le coagulum formé dans la cuve : trois essais ont été ainsi exécutés sur des fromages frais, l'un relatif à des fromages de gruyère, l'autre à des fromages du Cantal. Dans chacun de ces essais les deux fromages à comparer étaient fabriqués au même endroit, dans des conditions aussi semblables que possible, à partir de laits dont l'aptitude à la coagulation était nettement différente (c'est-à-dire qu'une cuve contenait un lait dont la durée de coagulation était plus longue que celle du lait de l'autre cuve).

Résultats : Ils sont rapportés dans le *tableau XX*. Deux essais (ceux des 7.12.50 et 5.8.50) correspondent aux échantillons de lait ayant servi à préparer les phosphocaséinates dont la teneur en eau figure dans les *tableaux XVIII* et *XIX*.

TABLEAU XX

Teneur en eau comparée des phosphocaséinates et des paracaséinates

Date	Lait	Temps de coagulation	Teneur en eau du coagulum	Mode de préparation
7.12.50	« Lent » L 10	364	63,5	Coagulum centrifugé 5 min. à 50.000 tours
	« Rapide » R 3	83	62,85	
10.12.50	« Lent » L 10	420	71,4	Coagulum centrifugé 5 min. à 30 000 tours
	« Rapide » R 3	50	70,15	
5.8.50	Cuve « Lente » L 17	157	40,6	Fromage (gruyère) A la fin de l'égouttage
	Cuve « rapide » R 17	100	39,5	
11.4.50	Cuve « lente » L 18	305	44,7	Fromage (Cantal) A la fin de l'égouttage
	Cuve « rapide » R 18	100	42,2	
12.4.50	Cuve « lente » L 19	225	46,1	id.
	Cuve « rapide » R 19	100	44,35	

On voit que les différences entre laits « lents » et laits « rapides » existent aussi dans le cas du gel de paracaséinate : le paracaséinate du lait « lent » est plus humide que le paracaséinate du lait « rapide », qu'il s'agisse de paracaséinates obtenus au laboratoire par supercentrifugation ou de caillés égouttés à la fromagerie.

L'amplitude des variations est comparable à celle observée pour les phosphocaséinates.

La conclusion des observations précédentes est que *l'affinité plus ou moins grande pour l'eau est une propriété du phosphocaséinate, tel qu'il se trouve dans le lait ; l'intervention de la présure qui transforme le caséinate en paracaséinate ne modifie pas cette propriété.*

Dans la pratique, c'est au moment de la coagulation du lait par la présure et pendant l'égouttage ultérieur du gel que le fromager met le phénomène en évidence.

4° Proportion de caséine sédimentée au cours de la supercentrifugation

On a vu qu'après la supercentrifugation une certaine proportion de la caséine du lait se trouve déposée, sous forme de phosphocaséinate de calcium, sur la paroi du bol tandis qu'une autre fraction demeure en suspension dans le lactosérum.

Nous avons étudié, pour des vitesses et des durées de supercentrifugation égales mais en partant d'échantillons de laits différents (laits « lents », laits « rapides », laits de « mélange »), les variations du rapport :

$$Q = \frac{\text{Poids de caséine sédimentée}}{\text{Poids total de caséine}} \text{ ‰ de lait.}$$

La valeur du rapport Q a été déduite des données analytiques suivantes :

- a) teneur en azote du lait NT,
- b) teneur en azote du lactosérum NL,
- c) teneur en azote du filtrat obtenu après précipitation de la caséine à pH 4,6 selon la technique de ROWLAND (10) NS.

(NL et NS doivent être rapportés à 1 000 g de lait). Dans ces conditions :

$$Q = \frac{NT - NL}{NT - NS}.$$

Résultats. — Les conditions de la supercentrifugation étant les mêmes, on observe que le rapport (Q) est plus élevé, i.e., la proportion de caséine sédimentée est plus grande pour les laits « rapides » et les laits de « mélange » que pour les laits « lents » (*tableau XXI*).

TABLEAU XXI
Proportion de caséine sédimentée

Laits « lents »		Laits « rapides »		Supercentrifugation		
N ^o de la vache	Q (% de caséine sédimentée)	N ^o de la vache	Q (% de caséine sédimentée)	Durée	Tempé- rature finale	Vitesse (tours/minutes)
L 1.....	82,7	R 1	86,9	1 h	21°	30 000
L 1.....	83,8	R 1	87,9	1 h	28°5	30 000
L 2.....	88,9	R 2	89,9	1 h	34°5	30 000
L 3.....	85	R 3	87,9	1 h	15°5	30 000
L 5.....	79,2	M j ⁽¹⁾	92,4	1 h	11°	40 000
L 3.....	51,7	R 2	94,5	1 h	17°	50 000
L 6.....	84,5	R 3	95	1 h	32°	50 000
L 1.....	90,3	R 1	92,4	1 h	20°	50 000
L 6.....	20,15			5 min	18°	50 000
	78,1			1 h	20°	50 000
L 16 ⁽²⁾	50,3	R 5 ⁽²⁾	56,2	5 min	21°	50 000
	91,6		92,7	1 h	18°	50 000

⁽¹⁾ Lait de mélange.

⁽²⁾ Provenant de 5 vaches.

On note également que la différence est d'autant plus marquée que la durée de centrifugation est plus courte : par exemple, après 5 minutes de centrifugation 56,2 % de la caséine du lait « rapide » R 5 a été sédimentée tandis que 50,3 % seulement de la caséine du lait « lent » L 16 et 20,15 % de la caséine du lait « lent » L 6 se sont déposées dans les mêmes conditions.

Après une heure de supercentrifugation la différence subsiste, mais elle est moins marquée : 92,7 pour R 5, 91,6 pour L 16 et 78,1 pour L 6.

Ces résultats semblent montrer que dans les laits à coagulation lente, le phosphocaséinate est dispersé sous forme de particules plus petites, possédant une vitesse de sédimentation plus faible que les particules de lait « rapide ».

De même HOSTETTLER et IMHOF (24) ont trouvé une relation inverse entre la dimension moyenne des particules de phosphocaséinate de calcium examinées au microscope électronique et le temps de coagulation par la présure : plus les particules sont petites, plus le temps de coagulation est long.

Nos résultats paraissent en bon accord avec l'observation de HOSTETTLER.

Il est, d'autre part, intéressant de comparer la proportion de caséine sédimentée au cours de la supercentrifugation et celle de la « caséine coagulée » par l'action de la présure sur le lait (*tableau XXII*).

On voit que la différence entre laits « lents » et laits « rapides » est orientée de la même façon pour les deux types de laits.

TABLEAU XXII

Relation entre les proportions de caséine sédimentée par supercentrifugation et de caséine coagulée par la présure

Date	Échantillon de lait		Temps de coagulation	% de caséine sédimentée (1 h à 50 000 t)	% de caséine coagulée par la présure
31.3.50.....	Lent	L 1	1000	90,3	82,9
	Rapide	R 1	79	92,4	93,8
7.7.50.....	Lent	L 16	190	91,6	94
	Rapide	R 5	81	92,7	95
11.4.50.....	Lent	AL	173	—	90,7
	Rapide	AR	57	—	92,5
5.8.50.....	Lent	L 17	156	—	94,8
	Rapide	R 6	100	—	95,4

5° Teneur comparée en calcium et phosphore des sédiments obtenus après 5 minutes et après 1 heure de centrifugation

Le tableau XXIII montre que les sédiments obtenus en 5 minutes présentent des rapports Ca/N et P/N plus élevés que ceux des sédiments obtenus en 1 heure de centrifugation. Ce résultat confirme les observations de HOSTETTLER qui a constaté une teneur en substances minérales plus élevée dans les premières portions de phosphocaséinate sédimenté.

Il n'y a pas de différences à cet égard entre les laits « lents » et les laits « rapides ».

TABLEAU XXIII

Teneur comparée en calcium et en phosphore des sédiments obtenus après 5 minutes et après 1 heure de centrifugation

Date	Échantillon		Temps de coagulation	Durée de centrifugation	Ca/N	P/N
2.6.50	« Lent »	L 1	180	5 minutes	0,194	0,136
				1 heure	0,187	0,126
20.4.50	« Lent »	L 1	1000	5 minutes	0,202	0,132
				1 heure	0,196	0,126
	« Lent »	L 6	ne coagule pas	5 minutes	0,187	0,121
				1 heure	0,161	0,115
7.7.50	« Lent »	L 16	190	5 minutes	0,228	0,137
				1 heure	0,215	0,136
	« Rapide »	R 5	82	5 minutes	0,219	0,136
				1 heure	0,214	0,130

6° Affinité pour l'eau des sédiments de lait « mixte »

On a vu que la durée de coagulation des laits « mixtes » (phosphocaséinate « lent » + sérum « mélange » ou phosphocaséinate « mélange » + sérum « lent ») est intermédiaire entre celle du lait « lent » et celle du lait de « mélange ».

D'autre part le sédiment, obtenu par centrifugation, a une teneur en eau plus élevée dans le cas du lait « lent » que dans le cas du lait de « mélange ».

Cette teneur en eau du sédiment est-elle modifiée lorsque celui-ci est mis en suspension dans un lactosérum différent ? Autrement dit quelle est la teneur en eau d'un sédiment de lait « mixte » ?

Pour répondre à cette question l'essai suivant a été effectué :

Un lait « lent » L et un lait de « mélange » M ont été centrifugés et l'on a déterminé la teneur en eau de chacun des sédiments. Chacun des deux sédiments obtenus a ensuite été remis en suspension dans le lactosérum de l'autre, donnant ainsi deux laits « mixtes » :

sédiment lent + sérum mélange,

sédiment mélange + sérum lent.

Les laits « mixtes » à leur tour ont été centrifugés :

1° aussitôt après leur préparation,

2° après 3 jours de conservation à la glacière.

Les résultats figurent dans le *tableau XXIV*. Ils montrent que la teneur en eau des sédiments de lait « mixte » est intermédiaire entre celle du sédiment lent et celle du sédiment « mélange ». En outre on assiste au cours du temps à une variation progressive de cette teneur en eau traduisant les échanges qui se produisent entre le phosphocaséinate et le nouveau sérum dans lequel il se trouve mis en suspension.

TABLEAU XXIV

Affinité pour l'eau des sédiments de lait « mixte »

Date	Lait mixte	Teneur en substance sèche % du sédiment de lait mixte âgé de		Teneur en substance sèche % du premier sédiment	
		20 minutes	3 jours	« lent »	« mélange »
7-1-52	Phospho M + sérum L	28,5	27,4	26,7	29,2
10-12-51	Phospho L + sérum M	—	28,05	25,1	28,65
	Phospho M + sérum L	—	27,35	25,1	28,65

On peut penser que de tels échanges se produisent également lorsque, dans la pratique, on mélange le lait de plusieurs vaches.

7° Étude du comportement vis-à-vis de la présure des sédiments et des lactosérums de supercentrifugation

a) ACTION DE LA PRÉSURE SUR LES SÉDIMENTS

Le sédiment provenant de la centrifugation de 300 cm³ de lait est lavé, mis en suspension dans l'eau distillée de façon à rétablir le volume initial du lait, puis additionné de présure : il ne coagule plus mais l'addition d'une petite quantité de chlorure de calcium permet d'obtenir à nouveau la coagulation.

Le *tableau XXV* montre les doses de chlorure de calcium et de présure nécessaires pour obtenir la coagulation de trois phosphocaséinates provenant respectivement d'un lait de « mélange » (pris comme témoin) d'un lait « rapide » et d'un lait « lent ».

TABLEAU XXV

Coagulation par la présure d'une suspension de phosphocaséinate provenant de lait « lent », « rapide » ou « mélange »

Volume en cm ³ de la solution de chlorure de calcium (1)		Volume en cm ³ de la solution de présure commerciale à 0,4%	Lait « lent » A ₁₀		Lait de mélange		Lait « rapide » R ₃	
ajoutés à 10 cm ³ de la suspension de phosphocaséinate ou du lait.			Durée de coagulation		Durée de coagulation		Durée de coagulation	
			En secondes	% du mélange	En secondes	% du mélange	En secondes	% du mélange
Suspension de Phospho-caséinate	1	0	pas de coagulation		pas de coagulation		pas de coagulation	
	0	1	pas de coagulation		pas de coagulation		pas de coagulation	
	0,5	1	pas de coagulation		pas de coagulation		300	—
	1	1	pas de coagulation		570	100	205	36
	2	1	325	203	160	100	—	—
Lait	0	1	1815	284	685	100	345	50
Teneur de la suspension de phosphocaséinate en azote et calcium								
			N 0/00		3,35		3,29	
			Ca/N		0,212		0,214	

(1) Solution de chlorure de calcium : 1 cm³ contient 0,89 mg de Ca.

On voit que pour obtenir la coagulation il faut ajouter plus de chlorure de calcium au phosphocaséinate « lent » qu'au phosphocaséinate « mélange » et plus au phosphocaséinate « mélange » qu'au phosphocaséinate « rapide ». D'autre part, la durée de coagulation du phosphocaséinate est sensiblement proportionnelle à celle du lait utilisé pour sa préparation.

b) ACTION DE LA PRÉSURE SUR LES LACTOSÉRUMS

Le sérum provenant de la centrifugation d'un lait de « mélange », soumis à l'action de la présure dans les mêmes conditions que le lait, présente une opacification progressive qui débute au bout d'un temps un peu plus court que le temps de coagulation du lait. Cette opacification est suivie de l'apparition de flocons qui deviennent visibles au bout d'un temps un peu plus long que le temps de coagulation du lait.

Si l'on soumet à l'action de la présure des sérums de centrifugation provenant des laits « lents », « rapides » ou de « mélange », on constate que l'opacification et la formation des flocons se produisent au bout d'un temps proportionnel à la durée de coagulation des laits originels (*tableau XXVI*).

Avec certains laits « lents » qui ne coagulent pas par la présure, le lactosérum ne présente pas d'opacification, ni de formation de flocons.

TABLEAU XXVI

Comparaison entre les durées de coagulation du lait et d'opacification du lactosérum après l'addition de présure

	Durée de	
	Coagulation	Opacification
	Lait	Lactosérum de supercentrifugation
Lait de mélange M ₁	100	100
Lait lent L ₁	448	345
Lait de mélange M ₂	100	100
Lait lent L ₂	271	220

Dans un essai complémentaire, le lactosérum de centrifugation a été filtré sur disque d'amiante, du type couramment utilisé en bactériologie pour stériliser les liquides : on obtient ainsi un sérum presque limpide dont la teneur en azote est inférieure à celle du filtrat clair obtenu après précipitation de la caséine à pH 4,6, indiquant ainsi qu'une partie de l'albumine et de la globuline a été retenue sur le filtre d'amiante.

Or ce lactosérum presque limpide s'opacifie comme le précédent lorsqu'on lui ajoute de la présure et l'opacification devient visible au bout d'un temps voisin de celui qui est nécessaire pour obtenir la coagulation du lait, avec la même dose de présure et la même température d'incubation.

Nous avons préparé des lactosérums filtrés sur amiante à partir de lait « lent », de lait de « mélange » et de lait « rapide » et après addition de présure nous avons observé l'apparition du trouble : les résultats font apparaître, entre les durées d'opacification, les mêmes différences obser-

vées entre lait « lent », lait « rapide » et lait de « mélange » pour les durées de coagulation.

On peut admettre que les particules de phosphocaséinate responsables de l'opacification du lactosérum filtré sont les plus petites parmi celles qui existent dans le lait : les particules plus grosses sont en effet éliminées, d'abord par la supercentrifugation, ensuite par le passage sur amiante. L'influence de la grosseur des particules sur la vitesse de coagulation, signalée plus haut (24), n'intervient donc pas ici. Doit-on penser que l'influence des constituants solubles du lactosérum est prépondérante ? Ou bien est-ce une différence au niveau de la molécule de caséine qui serait le facteur déterminant ?

D'autres essais que nous allons décrire maintenant nous inclinent à penser que cette dernière hypothèse est celle qui rend le mieux compte des faits observés.

8° Stabilité des caséinates alcalins obtenus à partir de laits « lents » et de laits de « mélange » vis-à-vis de divers agents précipitants

SANDELIN (25) a noté que l'addition à un caséinate alcalin de quantités croissantes de chlorure de calcium, suivie d'une addition d'alcool éthylique, amène la formation d'un trouble, puis d'un précipité de plus en plus abondant.

Les doses de chlorure de calcium et d'alcool nécessaires pour entraîner l'apparition d'un trouble puis la floculation peuvent ainsi donner une mesure de la stabilité du caséinate.

Nous avons cherché à comparer, à cet égard, le comportement dans les conditions expérimentales décrites par SANDELIN, de caséinates préparés à partir de lait « lent » et de lait de « mélange ».

Pour entraîner le minimum d'altération possible dans la molécule de caséine de chacun de ces types de lait, nous avons préparé les caséinates de la façon suivante :

MODE OPÉRATOIRE. — 300 cm³ de lait écrémé sont centrifugés à 40 000 tours/minute pendant une heure. Le sérum est décanté et remplacé par un même volume d'eau distillée ; après passage au « turmix » on centrifuge à nouveau pendant une heure. Cette opération est répétée une seconde fois. Le sédiment (phosphocaséinate de calcium) est finalement remis en suspension dans l'eau distillée de façon à obtenir un volume total de 300 cm³. On ajoute 5 cm³ de chloroforme (pour empêcher le développement microbien) et 10 cm³ d'une solution d'oxalate de potassium, i.e. la quantité d'oxalate suffisante pour précipiter le calcium du caséinate.

Après repos d'une nuit à la glacière, on centrifuge le précipité d'oxalate de calcium (10 minutes à 6 000 tours/minute).

TABLEAU XXVII

Floculation des caséinates alcalins

Volume en cm ³ de			Caséinate du lait « lent »				Caséinate du lait « mélange »					
Solution de caséinate	Solution de chlorure de calcium	Eau	Teneur en		pH	Effet du chlorure de calcium (4)	Effet de l'alcool (4)	Teneur en		pH	Effet du chlorure de calcium (4)	Effet de l'alcool (4)
			Caséine (g/100 cc)	Ca (g/100 cc)				Caséine (g/100 cc)	Ca (g/100 cc)			
5	0	1	1,08	0	7,02	—	trouble +	1,26	0	7,32	—	trouble + +
5	0,5 (1)	0,5	»	0,007	6,89	—	floculation	»	0,007	6,98	—	floculation
5	0,1 (2)	0,9	»	0,015	6,72	—	»	»	0,015	6,91	—	»
5	0,25	0,75	»	0,037	6,51	trouble	»	»	0,037	6,73	trouble + + +	»
5	0,5	0,5	»	0,074	6,38	»	»	»	0,074	6,62	floculation	»
5	1	0	»	0,148	6,12	»	»	»	»	»	»	»
5	0,25 (3)	0,75	»	0,370	6,35	»	»	»	»	»	»	»
5	0,5	0,5	»	0,740	6,17	»	»	»	»	»	»	»
5	1	0	»	1,480	6,12	floculation	»	»	»	»	»	»

(1) Solution à 0,4 % : CaCl²·4H²O
(2) » 4 %
(3) » 8 %
(4) — pas de trouble
± très léger trouble
+ trouble dont l'intensité est proportionnelle au nombre de signes plus

La solution de caséinate est dialysée, à basse température, contre l'eau distillée, avec une lente agitation, jusqu'à l'élimination du phosphore minéral soluble.

A cette solution de caséinate dialysée on ajoute des quantités croissantes de CaCl_2 puis un volume fixe d'alcool à 95°.

RÉSULTATS (*tableau XXII*). — Pour une même quantité des deux caséinates « lents » et « mélange » on voit qu'il faut ajouter la même dose de chlorure de calcium pour obtenir un début d'opalescence, mais l'addition d'une dose plus forte de chlorure de calcium augmente rapidement le trouble et entraîne la floculation du caséinate « mélange » alors que le caséinate « lent » se trouble moins vite et nécessite l'addition d'une dose de chlorure de calcium quatre fois plus élevée que celle utilisée pour le caséinate « mélange » (1 cm³ de la solution à 8 % au lieu de 0,5 cm³ de la solution à 4 %) pour provoquer la floculation.

De même le trouble produit par l'addition d'alcool (avec la dose minima de chlorure de calcium ajoutée au caséinate) est plus intense dans le cas du caséinate « mélange ».

Ce résultat met en relief la stabilité plus grande du caséinate alcalin provenant de lait « lent » comparée à celle du caséinate préparé à partir du lait de « mélange ».

En outre, il semble indiquer que la différence entre lait « lent » et lait de « mélange » est susceptible de se manifester non seulement lorsque la caséine se trouve sous sa forme native (phosphocaseinate de calcium) mais encore lorsque cette caséine est présente à l'état de caséinate alcalin. Ceci suggère, dans le cas des deux laits que nous avons étudiés, une différence possible de constitution intéressant la caséine elle-même et confirme par conséquent la dernière hypothèse formulée au paragraphe précédent.

DISCUSSION

Les résultats exposés dans notre travail confirment l'existence de deux types de lait à coagulation défectueuse.

a) Le lait, produit par des animaux dont la mamelle est le siège d'une infection microbienne, se caractérise par un abaissement de la teneur en caséine et une élévation du taux des autres protéines, son pH est plus élevé que celui des laits de vaches saines.

b) Une deuxième catégorie correspond au lait produit par des animaux dont la mamelle n'héberge pas de germes microbiens, décelables par les méthodes d'examen bactériologique classiques.

Dans ce cas la proportion relative des différentes protéines du lait reste inchangée mais le taux de calcium et de phosphore, rapporté à celui des protéines, est moins élevé que chez les animaux dont le lait coagule

par la présure au bout d'un temps normal. Nous avons vu également que la dimension moyenne des particules, qui forment la suspension de phosphocaséinate de calcium, est plus faible et l'hydratation de ces particules relativement plus élevée que celles du lait à coagulation normale.

Le point que nous avons cherché à éclaircir est de savoir si le défaut de coagulation peut être attribué à l'un des facteurs énumérés ci-dessus, par exemple s'il provient d'une teneur trop faible en constituants minéraux et d'une certaine répartition entre la forme soluble et la forme insoluble de ces constituants, ou bien si ce défaut reflète également une modification de la molécule de caséine elle-même.

A côté de l'aspect scientifique, on doit considérer les incidences pratiques de ce problème sur la fabrication du fromage. Si l'équilibre minéral est seul en cause, on peut penser que le mélange d'un lait de coagulation défectueuse avec une quantité suffisante de lait à coagulation normale, ou encore l'addition d'une dose convenable de calcium soluble et de phosphates, devraient suffire à corriger les défauts de coagulation. Mais si la constitution de la molécule protéique intervient, on conçoit que des différences puissent subsister malgré le mélange avec d'autres laits et malgré l'addition de divers sels minéraux et qu'elles apparaissent plus tard dans les propriétés physiques de la pâte du fromage (comme cela a été indiqué par nos observations citées au début du travail).

Il semble notamment que la finesse des particules ne représente pas une cause directe du défaut de coagulation : les particules de phosphocaséinate qui restent dans le lactosérum de supercentrifugation filtré sur amiante sont certainement les plus petites. Cependant la différence entre lait « lent » et « rapide » s'observe encore, nous l'avons vu, sur les lactosérums : on serait donc tenté de l'attribuer aux constituants minéraux solubles du lactosérum. Mais cette manière de voir est contredite par les essais portant sur les phosphocaséinates lavés, avec lesquels la même différence s'observe à nouveau, en l'absence cette fois des constituants minéraux solubles du lactosérum.

Finalement on se trouve conduit à admettre soit que la dimension des particules de phosphocaséinate et la composition du lactosérum ont toutes deux sur la vitesse de coagulation des effets analogues, mais pouvant se manifester indépendamment l'un de l'autre, soit qu'une différence intéressant la molécule de caséine elle-même représente le véritable facteur qui conditionne la vitesse à laquelle se produisent la coagulation du lait et des phosphocaséinates ou l'opacification des lactosérums.

Les différences de comportement des caséinates solubles préparés à partir de laits « lents » ou « rapides », vis-à-vis des réactifs précipitants (alcool, chlorure de calcium) appuient cette dernière hypothèse.

L'existence de telles différences au niveau de la molécule de caséine

se trouve confirmée, par nos observations analytiques relatives à la teneur en phosphore organique des caséines de lait « lent » et des caséines de lait « rapide » : les premières ayant, dans la plupart des cas, une teneur en phosphore plus élevée que les secondes (*tableau XII*).

A ce sujet il est intéressant de considérer les résultats obtenus par CHANDA. Dans un travail récent (28) cet auteur a trouvé que la caséine provenant du lait de mammite présente un rapport N/P plus élevé que celui de la caséine du lait sain ; il a alors émis l'hypothèse que ces deux sortes de caséine — saine et mammiteuse — se distinguaient par leurs teneurs respectives en constituants α , β , γ . On sait que ces constituants, qui ont été mis en évidence par l'électrophorèse, se différencient notamment par un rapport N/P caractéristique de chacun d'eux.

Nous avons également trouvé une différence entre la teneur en phosphore des caséines de laits « lents » et celles de laits à coagulation normale. On peut remarquer au passage que cette différence est de sens opposé à celle trouvée par CHANDA entre laits de mammite et laits sains ; la teneur en phosphore des caséines de laits « lents » est en moyenne supérieure à celle des caséines de laits « rapides » ou de « mélange » (*tableau XII*).

L'hypothèse d'une proportion différente des divers constituants (α , β , γ) dans ces caséines serait assez séduisante, surtout si l'on tient compte des observations déjà faites par PYNE (29) au sujet de l'action différente qu'exercent la présure et les sels de calcium sur les constituants α et β de la caséine. Toutefois, certaines de nos propres constatations ne nous permettent pas de tirer pour l'instant une conclusion précise ; en effet, dans un premier travail (30) nous avons préparé les caséines de lait « lent » et de lait « rapide » sans trouver de différences notables dans leur teneur en phosphore, ni dans leur diagramme électrophorétique.

Même avec ces réserves, il semble que l'on puisse tirer des résultats analytiques du *tableau XII* une indication en faveur d'une différence de composition des caséines « lente » ou « rapide », et l'on peut alors admettre que cette différence de composition est un signe du rôle propre joué par la caséine dans la coagulation lente ou rapide du lait, le mécanisme de ce dernier phénomène restant à éclaircir.

Il ressort également de nos essais que l'équilibre entre des lactosérums et des phosphocaséinates d'origine différente s'établit de manière progressive, pendant les jours qui suivent le mélange. Il y a peu de chance, dans la pratique, pour que ces échanges puissent se poursuivre aussi longtemps : le plus souvent, en effet, la transformation du lait en fromage suit de près le mélange des laits individuels (quelques heures au plus). La séparation du paracaséinate insoluble met alors un terme aux échanges entre le lactosérum et le phosphocaséinate, conservant ainsi à ce dernier, en grande partie, ses caractères originaux.

Enfin, l'un des aspects les plus importants pour la fromagerie concerne le degré d'hydratation des particules, qui commande probablement le degré d'égouttage du fromage. Nos essais indiquent nettement que ce caractère est fixé dans le lait lui-même et que la coagulation par la présure ne le modifie pas de façon sensible.

RÉSUMÉ

1. — La proportion des animaux produisant un lait de bonne ou mauvaise coagulation a été établie. On a trouvé que la moitié seulement des laits à coagulation défectueuse présentaient également les caractères d'un lait de mammite.

2. — Les variations de l'aptitude du lait à la coagulation chez un même animal, en fonction du stade de lactation et au cours de plusieurs lactations successives, ont été étudiées.

3. — Les caractères analytiques des laits et de leurs constituants solubles ou insolubles font apparaître, notamment au point de vue de la teneur en calcium et phosphore, des différences notables et assez régulières en fonction de l'aptitude à la coagulation par la présure.

4. — La supercentrifugation a permis de séparer le sédiment (phosphocaseinate) et le lactosérum de laits « lents », « rapides » ou « mélange » et de « reconstituer » les laits « mixtes » dont la réaction vis-à-vis de la présure est intermédiaire entre celle des laits composants.

5. — Il paraît probable que la constitution particulière de la molécule de caséine joue un rôle dans l'aptitude du lait à coaguler par la présure.

REMERCIEMENTS

Le prélèvement de nombreux échantillons de lait dans les étables, leur expédition au laboratoire ainsi qu'un grand nombre de déterminations de la durée de coagulation du lait par la présure ont été effectués par MM. BLANC-PATIN, MOSER et JEUNET, à la Station de Recherches laitières de Poligny. Nous tenons à leur adresser tous nos remerciements pour cette contribution très appréciable à notre travail.

(Reçu pour publication le 8 décembre 1953).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) KOESTLER (A. G.). — Different types of milk, their relations to the rennet and their importance in cheese making. *J. Dairy Sci.*, **8**, 28 à 36, 1925.
- (2) McDOWALL (F. H.), DOLBY (R. M.) et McDOWELL (A. K. R.). — The coagulation of milk with rennet. *J. Dairy Res.*, **8**, 31 à 52, 1937.
- (3) PELTOLA (E.). — The coagulation of milk of the Finnish cows with rennet. XII^e Congrès Int. Laiterie, Stockholm, **2**, 73-80, 1949.
- (4) LING (E. R.). — The composition of milk and whey. *J. Dairy Res.*, **8**, 173 à 193, 1937.

- (5) STORCH et SEGELKE. — Versuche über das Gerinnen der Milch. *Milchzeitung*, **3**, 997, 1874.
- (6) VILEGHZANIN (M. Z.). — Vyysnenie Prichiny Sychuzhnoy Vyalosti Moloka. *Proc., Vologda Agric., Inst.*, **5**, 275 à 309, 1942.
- (7) HOSTETTLER (H.), RYCHENER (E.) et KUNZLE (L.). — Untersuchung über das in der Kuhmilch im nativem Zustand vorliegende Kasein. *Landw. Jb. Schweiz*, **65**, 31 à 68, 1949.
- (8) PYNE (G. T.). — Rennet hysteresis and the calcium phosphate of milk. *Biochem. J.*, **39**, 385 à 390, 1945.
- (9) VAN DAM (W.). — Beitrag zur Kenntnis der Labgerinnung. *Zeitschrift physiol. Chem.*, **55**, 295 à 330, 1908-1909.
- (10) ROWLAND (S. J.). — The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. Dairy Res.*, **9**, 42 à 46, 1938.
- (11) NICLOUX (M.). — Titration finale de l'ammoniaque dans le microdosage de l'azote par la méthode Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**, 483-488, 1939.
- (12) NAVELLIER (P.). — Appareil à entraînement à la vapeur d'eau pour dosage rapide. Application à la détermination de l'ammoniac au cours de la méthode Kjeldahl. *Chim. Anal.*, **11** (bis), 33, 1951.
- (13) PYNE (G. T.). — On the use of various sera for the determination of the soluble calcium and phosphorus in milk. *J. Dairy Res.*, **11**, 292 à 297, 1940.
- (14) PYNE (G. T.). — The microdetermination of calcium and magnesium in milk. *Analyst*, **62**, 330, 1943.
- (15) BRIGGS (A. P.). — Some applications of the colorimetric phosphate method. *9. Biol. Chem.*, **59**, 255 à 264, 1924.
- (16) GRAHAM (W. R.) et KAY (H. D.). — Phosphorus compounds in milk. *J. Dairy Res.*, **5**, 54 à 62, 1934.
- (17) LANGE (K.) et MIETHKE (H.). — Mikromethoden in der Milchanalyse. *Milchewirt. Forsch.*, **14**, 1, 1932.
- (18) DE KADT (G. S.) et Van MINNEN (G.). — Condition of casein and salts in milk. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **62**, 257 à 271, 1943.
- (19) PORCHER (C.). — Recherches sur le mécanisme de l'action de la présure. *Lait*, **100**, 1.123, 1930 et **101**, 1, 1931.
- (20) DAVIS (J. G.) et McCLEMONT (J.). — Studies in Mastitis. *J. Dairy Res.*, **10**, 94 à 107, 1939.
- (21) MATTICK (E. C. V.) et HALLETT (H. S.). — The effect of heat on milk. *J. Agric. Sci.*, **19**, 452, 1929.
- (22) GRIMMER (W.) et PAAPE (W.). — Beitrag zur Kenntnis der Säuerung der Milch. *Milchewirt. Forsch.*, **9**, 88, 1930.
- (23) RAMSDELL (G. R.) et WHITTIER (E. O.). — Composition of casein in milk. *J. Biol. Chem.*, **154**, 413-419, 1944.
- (24) HOSTETTLER (H.) et IMHOF (K.). — Elektronoptische Untersuchungen über die submikroskopische Struktur von Milch und Milchzeugnissen. *Landw. Jb. Schweiz*, **66**, 309, 1952.
- (25) SANDELIN (A. E.). — Untersuchungen über das Casein. *Meijeritieteelinen Aikakauskirja*, **1-2**, 1 à 65, 1943.
- (26) ROWLAND (S. J.) et ZEIN EL DINE (M.). — The casein number as chemical method for diagnosis of mastitis. *J. Dairy Res.*, **9**, 174 à 181, 1938.
- (27) MOCQUOT (G.), CHEVALIER (R.), BARNIER (R.), AUCLAIR (J.) et ALAIS (C.). — Étude sur le dépistage des mammites et leur traitement par la pénicilline dans la région du gruyère. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **35**, 30, 1949.
- (28) CHANDA (R.). — The effect of mastitis on the carotenoids, vitamin A and phosphorus compounds of milk. *Biochem. J.*, **54**, 68, 1953.
- (29) PYNE (G. T.). — *Chemistry and Industry*, March 3rd, 1951.
- (30) CHEVALIER (R.), MOCQUOT (G.), ALAIS (C.) et BONNAT (M.). — Relation entre la composition du phosphocaseinate de calcium et l'aptitude du lait à coaguler par la présure. *C. R. Acad. Sc.*, **231**, 249-251, 1950.

A PROPOS DE LA MATURITÉ DES RAISINS DE TABLE

PAR

P. GALZY ET J. M. EVESQUE

Laboratoire de recherches de la Chaire de Technologie
(Œnologie et Industries Agricoles)
de l'École Nationale d'Agriculture de Montpellier,
Centre de Recherches Agronomiques du Midi

PLAN DU MÉMOIRE

- I. — **Objet de l'étude.**
 - II. — **Protocole expérimental.**
 - III. — **Résultats.**
 - Chasselas de l'Hérault.
 - Chasselas d'Alés.
 - Alphonse Lavallée.
 - Autres cépages.
 - IV. — **Conclusions.**
 - V. — **Bibliographie.**
-

I. — OBJET DE L'ÉTUDE

La détermination de la maturité de cueillette pour les raisins de table a fait l'objet de plusieurs études, notamment par :

HUGUES et BOUFFARD à Montpellier (1),

CHEVALIER en Algérie (2),

MATHIEU en Avignon (3).

En 1950, s'appuyant sur ces travaux, E. NÈGRE, dans une communication au congrès des producteurs de raisins de table, proposait de prendre comme test le rapport Sucre/Acidité en adoptant le nombre 25 pour les raisins mûrs. Mais, pour tenir compte du désir légitime des producteurs, de profiter des cours élevés des débuts de campagne, il conseillait, compte tenu de ce que les consommateurs n'ont pas encore pris l'habitude de raisins très sucrés, d'accepter un rapport plus faible 22 : pour les débuts de cueillette. Il estimait qu'il fallait,

avant tout, ne pas décourager les consommateurs d'acheter des raisins, ce qui se produit lorsqu'on leur offre des fruits insuffisamment mûrs.

D'autre part, pour tenir compte de l'effet organoleptique de la concentration en ions H^+ , il conseillait l'étude d'un test comportant le pH du moût.

Les valeurs 25 et 22 furent adoptées, mais le Congrès de 1953 les abandonna pour un nombre beaucoup plus bas : 17 pour toute la Campagne.

Sous la direction de M. le Professeur E. NÈGRE nous avons entrepris l'étude qui va suivre, afin de vérifier :

1^o dans quelles mesures ce chiffre est acceptable et, dans ce cas comment il convient de l'interpréter.

2^o si l'on peut utiliser d'autres critères de maturité.

II. — PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Nous avons procédé au ramassage des raisins en plusieurs fois pour chaque cas considéré ; les prélèvements s'échelonnant sur plusieurs jours avant le début de la récolte commerciale, et sur quelques jours après.

Les raisins après cueillette, ont été dégustés par prélèvement de quelques grains au hasard et affectés d'une note.

L'échelle de dégustation adoptée est la suivante :

- 1 Très vert.
- 2 Vert.
- 3 Acceptable.
- 4 Mûr.

Nous avons adopté le terme « aspect » pour désigner la translucidité (ou l'opacité) des grains chez les raisins blancs, et le degré de coloration chez les noirs.

Le jus obtenu par pressurage de lots de 2 à 3 grappes ayant la même note a été analysé à 3 points de vue :

- 1^o Sucre (Exprimé en g/l).
- 2^o Acidité (Exprimé en g d'acide sulfurique par litre).
- 3^o pH.

A partir de ces résultats ont été calculés le rapport Sucre/Acidité ; l'acidité est exprimée en gramme d'acide tartrique par litre.

Le premier cépage étudié de cette manière a été le *Chasselas*, cépage autour duquel ont tourné, jusqu'à présent, toutes les discussions relatives à l'appréciation de la maturité.

Il a été ensuite procédé à l'étude d'un cépage noir, l'*Alphonse de Lavallée*, afin de savoir si les résultats obtenus pour le chasselas pouvaient être généralisés.

Dans cet ordre d'idée, nous avons cru bon de faire une comparaison avec les résultats que nous ont fournis des cépages de cuve.

Présentation des résultats

Les résultats analytiques ont été consignés en divers tableaux joints au texte. Pour les tableaux IV et V ils sont donnés intégralement. Pour les autres tableaux ils ont été groupés en séries naturelles, en fonction de l'aspect et du goût. Pour chacune de ces séries n'ont été données que les extrêmes (en italique) et les moyennes (en caractères gras) ; les tableaux représentent les moyennes d'analyse, de plus de 300 échantillons.

III. — RÉSULTATS

1° Chasselas

La détermination du seuil de maturité pour le chasselas, a été effectuée dans 2 régions différentes, afin de savoir si le climat ne donnerait pas de différences notables.

Les résultats sont consignés dans 2 tableaux : le tableau I groupe les résultats obtenus dans la vallée moyenne de l'Hérault, le tableau II ceux obtenus dans la région d'Alès.

a) Vallée moyenne de l'Hérault

La teneur en sucre présente des variations sensibles pour une même note de dégustation. Un lot noté 2, a une teneur en sucre de 154 g. Par contre on peut trouver un lot noté 3 ayant seulement 138 g de sucre par litre. Au-dessous de 135 g par litre, un raisin est nettement vert, au-dessus de ce chiffre il est difficile d'établir une classification sur la seule teneur en sucre.

L'acidité, exprimée en gr d'acide sulfurique par litre, donne des résultats qui ne paraissent pas plus nets. Les lots, d'acidité inférieure à 5,5 sont tous classés acceptables ou mûrs ; au-dessus de 5,5 la plupart sont classés verts, mais il y a une dizaine d'exceptions sur 46 résultats (lots à acidité comprise entre 5,5 et 6 et classés « acceptables »).

Le pH varie assez peu (2,9 à 3,4) et de façon trop irrégulière pour constituer un bon critère.

Quant au produit $S \times pH$, il reflète les irrégularités des teneurs en sucre et du pH . Dans l'ensemble, cependant, ce produit donne des résultats plus réguliers que les 2 séries de valeurs prises séparément. Au-dessus de 500 on trouve des lots mûrs, ou du moins acceptables ; au-dessous de 420, les raisins sont inconsommables.

Malgré ce, le rapport sucre/acidité semble donner le test le plus sûr

et, le plus fidèle. Le seuil de 16 permet de séparer les raisins verts des raisins acceptables : 4 lots notés 2 ont un rapport de 16 ; 3 lots sur 46 notés 3 ont un rapport de 15. Les exceptions sont donc peu nombreuses. Il faut noter en outre que les raisins dont le rapport est inférieur à 17 sont à peu près toujours opaques.

TABLEAU I

Analyses de Chasselas de la vallée moyenne de l'Hérault

Abréviations : S = Sucre en gr/l ; A = acidité en GrSO₄H₂/l.

Note = note de dégustation : 1 = très vert, 4 = mûr ; S/A = rapport sucre en gr/l/ Acidité en gr acide tartrique/litre.

Les moyennes sont en caractères gras, les extrêmes en italique.

Note	S	A	pH	S/A	S × pH	Aspect
1	129,5	9,40	2,95	9	332	très opaque
	133	9,10	2,97	9,5	398	
	138	8,80	3,00	10	414	
2	114,7	8,70	2,95	8	340	très opaque
	133,0	7,50	3,10	12	412	
	146,7	6,20	3,30	15	469	
2	146,7	7,1	3,12	15	459	opaque
	150,1	6,50	3,18	15	477	
	154,3	5,75	3,35	16	502	
2	144,5	6,05	3,15	16	459	légèrement opaque
	145,7	5,96	3,16	16	459	
	146,7	5,85	3,2	16	460	
3	135,9	6,8	3,10	15	462	légèrement opaque
	149,9	6,21	3,23	16	483	
	158,6	5,5	3,4	16	503	
3	138	5,7	3,05	17	420	légèrement translucide
	141,3	5,4	3,22	17,5	460	
	146,7	5,1	3,40	18	500	
3	138	5,35	3,15	18	434	translucide
	159,9	4,86	3,25	22	521	
	172,9	3,85	3,4	30	557	
4	148,9	5,60	3,27	18	506	translucide
	171,3	4,23	3,31	27	571	
	184,0	3,50	3,40	33	607	

b) Région d'Alès

Les résultats du tableau II, relatifs à la région d'Alès, sont assez comparables aux précédents.

Une *teneur en sucre*, inférieure à 140 g par litre, correspond ici à des lots verts. Au-dessus de 145 g/l, on ne trouve que des lots acceptables ou mûrs.

Le point de passage pour l'*acidité*, entre les raisins inconsommables et les lots acceptables, semble être 6.

Le pH varie comme précédemment de 2,9 à 3,4. Les variations sont bien faibles pour être considérées comme significatives.

Le *produit sucre × pH* présente, ici aussi, de grandes irrégularités et ne

peut être pris comme critère ; il n'y a pas de différences nettes pour les valeurs de ce rapport observées dans les 2 régions étudiées.

TABLEAU II

Analyses de Chasselas de la région d'Alès

Abréviations : comme tableau I.

Note	S	A	pH	S/A	S × pH	Aspect
2	99,0	9,5	2,90	7	287	vert très opaque
	112,4	8,8	2,98	8	332	
	138,0	7,9	3,05	9	420	
2	112,6	9,0	2,95	10	336	très opaque
	127,3	6,7	3,03	12	386	
	137,0	6,2	3,15	14	424	
3	131,7	6,2	3,05	14	402	légèrement opaque
	139,5	5,8	3,10	15	432	
	146,7	5,5	3,20	16	457	
3	141,3	5,6	3,10	17	437	légèrement translucide
	147,6	5,7	3,20	17	472	
	151,0	5,8	3,25	17	490	
3	142,4	5,6	3,15	17	447	translucide
	149,7	5,2	3,22	19	481	
	160,8	4,6	3,30	20	523	
4	153,2	5,1	3,15	20	484	translucide
	164,5	4,7	3,23	23	530	
	177,3	4,2	3,35	27	564	

Quant au rapport S/A , tous les lots ayant un rapport de 17 ou au-dessus ont été acceptés. Au-dessous, les lots ont été déclarés verts ; il y a 3 exceptions sur 48 échantillons, un lot à 14, un lot à 15, un lot à 16, qui ont été acceptés.

TABLEAU III

Analyses de Chasselas de la région de Montpellier

Note	S	A	pH	S/A	S × pH	Aspect
2	132,7	6,1	3,05	15	405	opaque
	133,7	5,8	3,06	15	409	
	134,8	5,7	3,10	15	418	
2	134,8	5,5	3,10	17	424	légèrement opaque
	139,1	5,5	3,10	17	432	
	145,6	5,4	3,15	18	452	
3	132,7	5,3	3,10	17	412	légèrement translucide
	135,9	5,2	3,12	17	424	
	141,2	5,2	3,15	18	439	
3	134,8	4,9	3,15	19	425	translucide
	142,9	4,7	3,17	20	454	
	151,0	4,6	3,20	21	483	

Un certain nombre de raisins récoltés près de Montpellier, ont été analysés et dégustés (tableau III). Les résultats obtenus sont comparables aux précédents, bien qu'ils soient, à eux seuls, trop peu nombreux pour permettre une conclusion définitive.

Enfin, une étude a été réalisée pour voir, si une différence de terrain pouvait influencer les résultats obtenus. Nous avons pensé qu'une différence de terrain, en modifiant par exemple, la composition de l'acidité du raisin, pouvait modifier aussi le résultat de la dégustation. L'étude a été réalisée dans la vallée moyenne de l'Hérault, dans une même commune.

Les résultats n'ont pas fait apparaître des différences nettes ; nous ne les citerons pas, pour ne pas surcharger le texte.

Interprétation des Résultats

Le produit $\text{Sucre} \times \text{pH}$ donne des résultats très variables pour une même note de dégustation. Ces variations d'une part, la difficulté d'effectuer des mesures précises de pH sur le terrain, d'autre part, rendent son utilisation aléatoire.

Le rapport S/A semble demeurer le critère le plus sûr et le plus précis en même temps que le plus constant. Le seuil, au-dessous duquel les raisins sont verts c'est-à-dire inconsommables, est le même sensiblement partout. On peut le considérer comme indépendant :

- du sol,
- du climat,

au moins dans les limites de nos investigations. La question reste posée pour des régions de climats très différents.

Il peut être pris égal à 17, valeur qui ne nous semble ni sévère, ni trop libérale. A remarquer que, les résultats ainsi obtenus sont valables pour des raisins non ciselés. Après enlèvement des grains verts et des petits grains il faut s'attendre à trouver des résultats légèrement supérieurs. L'adoption d'un rapport de 17 pour de tels raisins (raisins ciselés, emballés, à la vente) ne paraît donc pas exagérée. D'ailleurs tous les raisins, dont le rapport est inférieur à 17 ont été classés comme opaques.

Quel est le sens exact de ce rapport de 17 ? C'est la valeur au-dessous de laquelle un raisin est pratiquement inconsommable. Dans ces conditions, adopter 17 pour définir la maturité d'un lot de plusieurs tonnes revient à courir le risque d'erreurs grossières. En effet, un convoi de raisins qui aurait une valeur moyenne du rapport inférieur à 17 serait inutilisable pour la table comme pour la cuve. Un rapport de 17 signifierait la présence d'une proportion importante de raisins à rejeter. Il convient donc, si l'on adopte ce nombre, de définir la proportion maximum de raisins ayant un rapport inférieur à 17 qu'un cageot peut contenir, ce nombre étant naturellement plutôt faible.

L'examen des divers résultats obtenus et l'expérience des viticulteurs montrent qu'un raisin blanc mûr, est translucide. Un raisin à pellicules opaques est en général loin de la maturité commerciale. La cueillette des seuls raisins translucides, permet d'éliminer de façon satisfaisante les raisins verts. Si l'on songe que le raisin est en général cueilli, ciselé, puis emballé par 3 personnes différentes, il est très possible d'éliminer le raisin vert. Ainsi conçu, ce seuil de 17 serait acceptable.

17 est réellement un nombre minimum qui ne saurait être pris comme moyenne mais comme extrême. La conception de la maturité chez les viticulteurs confirme bien souvent notre opinion, ce que montrent les deux exemples suivants :

1^o Le premier jour de la campagne de raisin de table dans la Vallée moyenne de l'Hérault nous avons effectué la cueillette complète de 2 souches, dans une vigne, où le ramassage ne devait commencer que 3 jours plus tard. Les résultats de nos analyses sont consignés dans le tableau IV.

TABLEAU IV
Cueillette de deux souches complètes

Note	Sucres (S) g/l	Acidité (A) grl	pH	S/A	S × pH	Observations
2	138	5,1	3,05	18	420	translucides
2	138	5	3,15	18	434	translucides
3	142,4	4,6	3,1	20	443	translucides
3	157,6	4,4	3,2	23	505	translucides
3	172,9	3,85	3,2	30	553	translucides
4	172,9	3,8	3,3	30	570	translucides
4	177,3	3,9	3,3	30	584	translucides
4	179,5	3,9	3,3	30	594	translucides
4	175,1	3,6	3,35	32	586	translucides
4	181,8	3,6	3,3	33	599	translucides
4	172,9	3,5	3,3	33	570	translucides

Ils sont très au-dessus du rapport 17 préconisé par le congrès de 1953. Remarquons en outre que les viticulteurs de cette région ont l'habitude de ne cueillir qu'une partie des raisins dans leur vigne en début de saison, repassant ensuite, quelques jours après, pour ramasser ce qui reste. Dans ces conditions, les lots figurant au début du tableau, n'auraient pas été cueillis pour la vente.

Les rapports S/A des lots à la vente auraient donc eu une valeur de l'ordre de 30.

2^o Le même jour, dans la même région, après le passage des ouvriers chargés de la cueillette, nous avons procédé à la récolte complète de 2 souches. Les raisins ainsi ramassés avaient donc été considérés par

les ouvriers comme insuffisamment mûrs. Les résultats d'analyse et de dégustation sont rapportés dans le tableau V.

TABLEAU V
Cueillette de 2 souches après un premier ramassage

Note	Sucres (S) g/l	Acidité (A) g/l	pH	S/A	S × pH	Observations
2	148,9	6,3	3,15	15	469	légèrement opaques
2	146,7	6,3	3,15	15	459	
2	153,2	5,75	3,2	16	489	légèrement opaques
2	144,5	5,85	3,2	16	460	
2	146	6,05	3,15	16	459	légèrement opaques
2	146,7	6	3,15	16	459	
2	143,4	6	3,15	16	450	
3	161,9	5	3,28	21	534	translucides
3	159,7	5,35	3,2	20	512	translucides
3	161,9	5	3,3	21	534	translucides
3	164,1	5,1	3,25	21	533	translucides
3	164,1	4,9	3,3	21	541	translucides
3	164,1	4,7	3,25	23	533	translucides
3	168,5	4,45	3,3	25	557	translucides
4	184	4,5	3,27	27	607	translucides
4	179,5	4,25	3,3	28	594	translucides

Si une partie de ces raisins présente un rapport inférieur à 17, nous en trouvons un certain nombre présentant des rapports compris entre 20 et 25. On peut relever même des rapports de 27 et 28. Par conséquent ces ouvriers, qui n'ont jugé la maturité qu'à l'aspect, rejoignent sans le savoir l'opinion des techniciens qui avaient fixé la maturité commerciale à 25.

2° Alphonse de Lavallée

Le deuxième cépage étudié, l'Alphonse de Lavallée, a donné des résultats assez voisins des précédents (tableau VI).

La teneur en sucre présente de grandes variations, et une irrégularité assez forte.

L'acidité ne permet pas, à elle seule, de déterminer la maturité ; au-dessus de 6, tous les échantillons sont classés verts. Au-dessous de 5,5 ils sont classés acceptables ; entre ces 2 valeurs la notation est variable.

Le produit $S \times pH$ reflète l'irrégularité des teneurs en sucres. Entre 370 et 420, la notation est très variable. On trouve un lot noté 3 pour un produit de 370 et un autre noté 2 pour un produit de 413.

Le rapport S/A donne des résultats beaucoup plus nets. Tout ce qui est inférieur à 16 est vert. De 16 à 20 les lots sont acceptables. A partir de 20 et au-dessus ils sont mûrs.

TABLEAU VI

Analyses d'Alphonse de Lavallée (une seule provenance)

Dans la colonne « aspect » on note la couleur. Le raisin, très coloré, n'est jamais translucide.

Note	S	A	pH	S/A	S × pH	Aspect
1	89,6	7,4	2,95	8	268	insuffisamment coloré
	109,4	6,7	3,00	11	326	
	121,0	6,0	3,00	12	363	
2	108,4	7,4	2,90	10	314	insuffisamment coloré
	121,0	6,3	2,98	12	359	
	140,2	5,4	3,10	15	413	
3	123,1	4,6	3,15	20	387	insuffisamment coloré
	130,0	4,4	3,15	20	410	
	137,0	4,2	3,15	20	431	
3	127,4	5,90	3,00	16	370	coloration correcte
	138,9	5,37	3,07	17	423	
	161,9	5,00	3,17	19	509	
3	126,3	5,3	3,20	20	403	bien coloré
	151,5	4,8	3,20	21	484	
	168,5	4,3	3,20	21	539	
4	138	5,7	3,10	19	441	bien coloré
	158,5	4,5	3,20	23	506	
	184,0	3,8	3,32	28	598	

Il résulte de toute cette étude que là aussi, le critère le plus sûr reste le rapport sucre/acide. Le seuil à adopter paraît être 16 en émettant sur son interprétation les mêmes réserves que pour le chasselas. Un raisin parfaitement coloré peut être insuffisamment mûr ; une tolérance plus large, sur un nombre maximum de raisins verts admis, sera peut-être nécessaire.

3° Autres cépages

Nous allons citer maintenant quelques résultats obtenus pour des cépages à 2 fins, c'est-à-dire pour des cépages de cuve qui sont parfois vendus comme raisins de table sur les marchés locaux : l'Ugni-Blanc et l'Aramon.

Pour le premier d'entre eux les résultats sont consignés dans le tableau VII. Ils permettent de voir que le seuil de 17 pour le rapport S/A est applicable. Pour le produit $S \times \text{pH}$, le seuil paraît être aux alentours de 415.

Par contre, pour l'Aramon dont nous donnons quelques résultats dans le tableau VIII, les conclusions semblent très différentes. Le rapport S/A à adopter paraît être 13 ou 14. Quant au produit $S \times \text{pH}$ il présente encore d'assez grandes irrégularités et, l'on peut trouver des lots acceptables à partir de 380.

TABLEAU VII

Analyses d'Ugni blanc (une seule provenance)

La colonne « aspect » n'a pas été prévue dans la dégustation.

Note	S	A	pH	S/A	S × pH
2	138,0	7,0	2,78	10	403
	140,0	6,6	2,85	12	405
	142,4	6,2	2,87	15	408
3	148,9	5,6	2,82	17	419
	156,4	5,00	2,91	20	455
	161,9	4,5	3,01	22	485
4	159,7	4,7	3,00	22	485
	170,0	4,4	3,07	25	522
	181,8	4,0	3,18	30	578

TABLEAU VIII

Analyses d'Aramon (une seule provenance)

Note	S	A	pH	S/A	S × pH
2	87,5	7,7	2,63	7	238
	119,6	7,2	2,71	11	324
	141,7	6,4	2,82	14	394
3	138,0	7,3	2,78	13	383
	153,2	6,9	2,85	14	438
	161,9	6,4	2,96	15	479
4	151,0	6,9	2,72	16	410
	167,6	6,0	2,88	18	486
	181,8	5,0	3,01	20	551

L'Aramon a donc un rapport S/A minimum différent de celui des autres cépages étudiés.

Le parfum spécial des muscats, intervenant dans les équilibres organoleptiques du raisin, rendra nécessaire une étude particulière de ces cépages.

IV. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le produit $S \times \text{pH}$, ne paraît pas fournir un test intéressant pour la détermination d'un seuil de maturité.

Le rapport S/A, demeure le moyen le plus simple, le plus rapide, et le plus précis de contrôler la maturité des raisins de table. La fixation de ce rapport minimum est très délicate, car elle dépend des goûts du consommateur. Cependant il nous semble que, les rapports suivants constituent pour les cépages cités, le strict minimum. Les raisins dont l'analyse fournit une valeur moindre étant inconsommables.

Chasselas 17, Alphonse de Lavallée : 16, Aramon : 14.

Ces rapports minima, étant fixés, il reste à déterminer le nombre minimum de grappes vertes de rapport S/A inférieur aux nombres précités, admissibles par cageots (2 ou 3 par exemple).

Les rapports cités ne sont, vraisemblablement valables, que pour les cépages étudiés. Par contre pour un même cépage, le rapport ne semble pas varier avec le sol et le climat, au moins dans le cadre de nos investigations. Son utilisation paraît donc souhaitable et pourra certainement aider considérablement à l'assainissement du marché.

Note de M. E. Nègre Professeur, Directeur du Laboratoire

Ces rapports minima peuvent varier avec les dégustateurs ; pour s'assurer de ne pas décevoir des consommateurs, ce qui irait à l'encontre de l'intérêt des producteurs, il convient donc :

- 1^o de ne pas choisir un rapport trop bas ;
- 2^o de penser que ce rapport minimum, pour le début de campagne ne correspond pas à des raisins mûrs, mais seulement « acceptables » ;
- 3^o de mettre en application la remarque judicieuse de MM. GALZY et EVESQUE, qu'en choisissant un tel rapport minimum, il est indispensable d'exiger que les lots de raisin mis en vente ne contiennent pas de fruit de rapport S/A inférieur à ce minimum ou pratiquement de n'accepter qu'une proportion très faible, à déterminer, de tels raisins. C'est une méthode d'évaluation des lots toute différente de celle qui est d'habitude utilisée.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) HUGUES (E) et BOUFFARD (E). — Sur la maturité des raisins de table. *Ann. Fals. et Fraudes*, **29**, p. 279, 1936.
 - (2) CHEVALIER. — La cueillette du raisin de table. Etude du degré de maturité en vue de l'exportation et la consommation. *Progrès Agricole et Vitic.*, **98**, p. 134, 1932.
 - (3) MATHIEU (G.). — Contrôle de la maturité des raisins de table dans la région d'Avignon. *Ann. Fals. et Fraudes*, **29**, p. 355, juin 1936.
 - (4) NÈGRE (E.). — Appréciation de la maturité des raisins de table. *Progr. Agri et Viti*. **134**, n^o 27-28, p. 5, 1950.
-

L'OXYDATION SULFO-CHROMIQUE DE L'ACIDE TARTRIQUE ET SON DOSAGE DANS LES MOÛTS ET LES VINS

PAR

A. PUISSANT

Station de Recherches Viticoles, Œnologiques
et d'Arboriculture Fruitière d'Angers

(avec la collaboration technique de J. HERVÉ)

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Généralités.

II. — Étude de l'oxydation de l'acide tartrique.

- 1^o Réaction d'oxydation.
- 2^o Influence de la concentration en SO_4H_2 .
- 3^o Influence de la température d'oxydation.
- 4^o Influence de la durée de chauffage.
- 5^o Influence de la concentration de la solution.
- 6^o Réduction de l'excès d'oxydant.

III. — Méthode de dosage.

- 1^o Isolement de l'acide tartrique.
- 2^o Oxydation.
- 3^o Appréciation de l'excès d'oxydant.
- 4^o Précision de la méthode.
- 5^o Précautions à prendre au cours des dosages.
- 6^o Application de la méthode au dosage de l'acide tartrique dans les moûts et les vins.

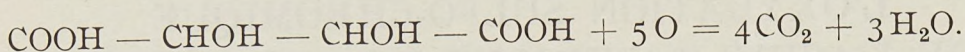
IV. — Conclusions.

V. — Bibliographie.

I. — GÉNÉRALITÉS

Au cours du dosage de l'acide tartrique dans les moûts et les vins selon la méthode au racémate de calcium, nous avons remarqué, lors de la titration de l'acide par le permanganate de potassium, le manque de fidélité de la méthode. PATO (1), dans un article paru dans le Bulletin de l'Office International du Vin, en avait fait la critique. Il nous a donc

semblé intéressant de rechercher un oxydant capable de transformer rapidement et complètement l'acide tartrique en gaz carbonique et eau selon l'équation :



En 1949, POUX et OURNAC (2) avaient mis en évidence le fait suivant : dans des conditions bien déterminées (pH 6,5 — 7, température 100°), l'oxydation de l'acide tartrique par l'acide périodique était complète au bout de 2 à 3 heures. Vers cette époque, nous avons orienté nos recherches sur l'emploi d'un autre oxydant, le bichromate de potassium.

Dès 1925 Kurt TAUFEL et Carl WAGNER (3) avaient indiqué la possibilité de doser l'acide tartrique par le mélange sulfo-chromique. Selon ces auteurs l'acide tartrique était quantitativement oxydé en gaz carbonique et eau, en présence de 5 ml. de bichromate de potassium N et de 15 ml. d'acide sulfurique concentré, après un chauffage à 110°, 120° et un séjour d'un quart d'heure au bain-marie bouillant. Pour rendre l'oxydation complète, ils limitaient la prise d'essai d'acide tartrique à la consommation de la moitié du bichromate de potassium. Après refroidissement et dilution du milieu avec 200 ml d'eau distillée, ils déterminaient iodométriquement l'excès de bichromate de potassium.

Quelques années avant POLONOMSHY (4) avait lui même dosé iodométriquement l'excès de bichromate de potassium dans son étude sur les indices chroniques.

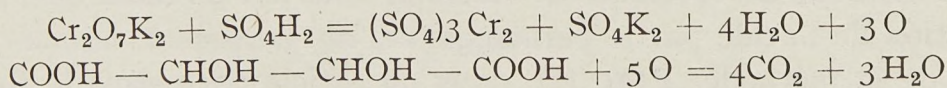
Plus tard SEMICHON et FLANZY (5) signalaient que dans les conditions où ils opéraient, l'oxydation de l'acide tartrique en gaz carbonique et eau était complète en moins d'une heure.

Par la suite FLANZY (6) en établissant sa méthode de dosage de faibles quantités d'alcool méthyliques comparait les procédés de réduction de l'excès oxydant par le sulfate ferreux avec indicateur externe, avec indicateur interne (diphénylamine) ou par la méthode iodométrique.

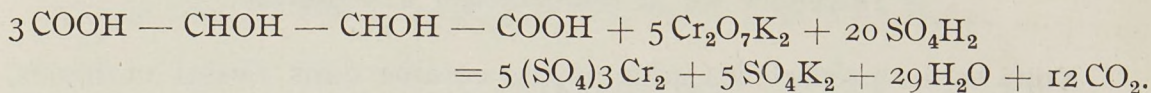
II. — ÉTUDE DE L'OXYDATION DE L'ACIDE TARTRIQUE PAR LE MÉLANGE SULFO-CHROMIQUE

1° Réactions.

Lors de l'oxydation de l'acide tartrique par la bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique, les réactions sont les suivantes :



la réaction totale devient :



Une molécule d'acide tartrique consomme 10 équivalents d'oxygène soit 490 grs. de bichromate de potassium.

Pour nous assurer que cette réaction était utilisable dans la pratique analytique, nous avons fait varier quatre facteurs de l'oxydation de l'acide tartrique par le bichromate de potassium à savoir :

- la concentration en acide sulfurique,
- la température d'oxydation,
- la durée du chauffage,
- la concentration des solutions de bichromate de potassium en rapport avec la concentration en acide tartrique.

Pour tous ces dosages, nous avons préparé par pesées des solutions contenant 5 g et 7 g d'acide tartrique pur Prolabo par litre. Ces solutions contrôlées à la soude N/10 nous ont servi à obtenir des solutions contenant 0,25 g, 0,35 g, 0,5 g, et 0,7 g d'acide tartrique par litre.

2° Influence de la concentration en acide sulfurique.

Dans les erlenmeyers ayant déjà reçu 20 ml d'une solution de bichromate de potassium, nous avons mis respectivement 5, 10, 15, 20, 25 ml. d'acide sulfurique concentré. Après refroidissement, nous avons ajouté 20 ml des diverses solutions d'acide tartrique. Pour chaque concentration en acide sulfurique, nous avons établi des témoins. Après agitation, le mélange a été porté aux environs de 110° puis une heure au bain-marie à 100°. Le liquide refroidi rapidement a été ensuite titré. Le tableau ci-après (tableau I) donne les pourcentages d'acide tartrique trouvés par rapport au chiffre théorique.

TABLEAU I

Conc. sol. en A., T., en mg p. 1. Oxydation sur 20 cc.

Conc. en SO_4H_2 concentré :	250	350	500	700
	%	%	%	%
5 cc.....	85,7	84	82,1	81,3
10 cc.....	97,4	96,3	94,7	92,1
15 cc.....	98,95	99,1	98,6	97,15
20 cc.....	100,1	99,8	99,7	99
25 cc.....	100,1	99,8	99,7	99

A la suite de ces résultats, nous avons été amenés à adopter la quantité de 20 ml d'acide sulfurique concentré, comme étant celle nécessaire et suffisante. Toutefois, nous avons voulu conduire quelques essais en utilisant seulement 15 ml.

3° Influence de la température d'oxydation.

Nous avons préparé les erlenmeyers comme dans l'essai ci-dessus, en veillant particulièrement au refroidissement des mélanges sulfochromiques avant l'addition de la solution d'acide tartrique. Les essais ont été conduits avec 15 et 20 ml d'acide sulfurique concentré et porté à des températures de 15° environ — 30° — 60° — 100° et 100° après, chauffage rapide à environ 110°. La durée du chauffage fut d'une heure exception faite des essais à environ 15° qui sont restés 36 heures. Nous savions déjà qu'à la température du laboratoire, la réaction était très lente. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II

Cons. sol. en A. T. en mg p. 1. Oxydation sur 20 cc.

Température	durée	SO ₄ H ₂	250	350	500	700
—	—	—	%	%	%	%
15°-18°	36 h	20 cc.	88,6	85,85	85,85	76,85
		15 cc.	81,6	82	78,1	73,7
30°	1 h	20 cc.	36,1	37,4	41,6	41,2
		15 cc.	14,6	14,8	17,3	20,3
60°	1 h	20 cc.	84,8	85,8	84,7	82,2
		15 cc.	63,15	64,9	62,35	63,5
100°	1 h	20 cc.	98,9	100	100	99
		15 cc.	100	100	99,3	96,95
110°-100°	1 h	20 cc.	100,1	100,1	99,8	99
		15 cc.	98,95	99,1	98,6	97,15

D'après ces résultats, il semble que la réaction soit complète après un séjour d'une heure au bain-marie bouillant. Cependant nous préférons continuer à amener rapidement la solution à 100-110° avant de la porter au bain-marie, étant ainsi assuré que dès le début du séjour au bain-marie le milieu se trouve à une température de 100°.

4° Influence de la durée de chauffage.

Nous avons opéré comme précédemment, mais en faisant varier la durée du chauffage au bain-marie bouillant (environ 100°). Dans chaque essai, la solution a été portée rapidement à 110°, comme indiqué plus haut.

Le tableau ci-dessus montre qu'il faut maintenir les erlenmeyers au moins 3/4 d'heure au bain-marie bouillant pour avoir en présence de 20 ml d'acide sulfurique concentré, un écart de moins de 1 % avec le chiffre théorique. Nous avons donc adopté la durée de chauffage d'une heure, laquelle nous a donné des résultats très voisins de ceux donnés par le calcul.

Notons toutefois que pour obtenir des résultats satisfaisants, l'erlenmeyer doit plonger dans l'eau bouillante. Nous avons remarqué également

que la forme du récipient avait une légère influence : ainsi, nous avons noté de petites différences en utilisant des ballons à fond plat.

TABLEAU III

Conc. sol. A. T. en mg p. 1. Oxydation sur 20 cc.

Durée de chauffage	conc. SO_4H_2	250	350	500	700
—	—	—	—	—	—
		%	%	%	%
110° et refroidi	20	90	82	75,8	68,9
	15	37	43	45	45,4
110° + 1/4 d'h 100°	20	100	98	97	96,85
	15	97	96,3	89,3	91,3
110° + 1/2 d'h 100°	20	98,5	98	98,2	97,4
	15	96,2	96,3	97	94,9
110° + 3/4 d'h 100°	20	99,3	99	99,3	99
	15	97,7	97,4	97,4	96
110° + 1 h à 100°	20	100,1	100	100	99
	15	98,9	100	99,3	97

5° Influence de la concentration de la solution.

Nous nous sommes proposés enfin de vérifier si la concentration de la solution de bichromate de potassium avait une influence sur la précision de la méthode. Pour cela, nous avons utilisé des solutions de bichromate de potassium N/10 et N/40. De même nous avons préparé des solutions d'acide tartrique deux fois plus ou deux fois moins concentrées que celles utilisées avec le bichromate de potassium N/20.

TABLEAU IV

Conc. sol. A.T. en mg p. 1. à multiplier par 0,5 1 ou 2 suivant les cas. Oxydation sur 20 cc. de cette solution.

Bichromate en g par litre	volume SO_4H_2 employé	250	350	500	700
—	—	—	—	—	—
		%	%	%	%
1,295	20	99,7	99	99,5	99
	15	100	98,6	99	98,3
2,450	20	100,1	99,8	99,7	99
	15	98,95	99,1	98,6	97,15
4,950	20	99,6	99,5	99,6	99,5
	15	99,6	99,5	99,5	99,2

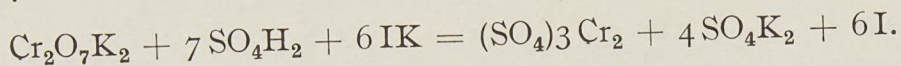
L'examen des chiffres du tableau précédent montre que la méthode peut être utilisée hors de limites étroites. Toutefois nous préférons personnellement utiliser le bichromate N/20, sauf lorsque la solution à doser est trop concentré en acide tartrique. Dans ce cas, nous avons alors recours à la solution oxydante N/10. Bien que la concentration en sels de chrome soit élevée, le virage reste encore net.

Dans la pratique, nous n'avons pas l'utilisation de la solution de bichromate N/40. Dans les conditions où nous l'avons employée au labo-

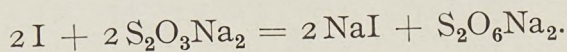
ratoire, l'utilisation de cette solution plus diluée nous paraît plus délicate.

6° Réduction de l'excès d'oxydant.

Le bichromate de potassium en excès libère rapidement en milieu assez riche en acide sulfurique l'iode de l'iodure de potassium selon la réaction :



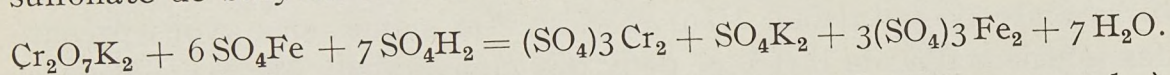
L'iode libéré est ensuite dosé par l'hyposulfite en présence d'empois d'amidon.



Une molécule de bichromate de potassium en excès correspond à 6 molécules d'hyposulfite de soude.

Théoriquement, un équivalent d'hyposulfite correspond à 1/5 d'équivalent d'acide tartrique.

Par la suite, nous avons essayé le sulfate ferreux comme réducteur du bichromate de potassium en excès en présence de diphenylamine sulfonate de baryum ou d'orthophénantroline ferreuse.



Une molécule de bichromate de potassium en excès correspond à 6 molécules de sulfate ferreux.

Théoriquement, comme pour l'hyposulfite, un équivalent de sulfate ferreux correspond à 1/5 d'équivalent d'acide tartrique.

III. — LA MÉTHODE DE DOSAGE

1° Isolement de l'acide tartrique.

Pour tous les dosages d'acide tartrique que nous avons effectués sur les moûts et les vins, nous avons eu recours à la technique d'isolement décrite par PEYNAUD (7). Toutefois, nous avons introduit quelques modifications, dont certaines ont été nécessitées par l'utilisation de notre nouvelle technique de dosage.

Ainsi, nous effectuons les lavages des précipités de racémate avec une solution alcoolique titrant environ 30°, comme l'a indiqué Poux dans sa microméthode (8).

Après le dernier lavage, nous chassons l'alcool retenu par le précipité, le filtre et le bécher, par un passage d'une heure à l'étuve à 100 — 104°. Après refroidissement, le précipité contenu sur le filtre et dans le verre est solubilisé par une solution d'acide sulfurique N/10 environ

et recueilli dans un fiole de 100 cc. C'est sur une partie aliquote de cette solution que sera effectué le dosage.

2° Oxydation.

A 20 ml d'une solution de bichromate de potassium N/10 ou N/20 introduits dans un erlenmeyer de 250 ou 350 ml, on ajoute 20 ml d'acide sulfurique concentré que l'on aura au préalable porté à l'ébullition pendant 1/4 d'heure. Après cette addition, on laisse refroidir, puis on ajoute 20 ml de la solution de racémate de calcium solubilisé dans l'acide sulfurique N/10. On porte rapidement à 100 — 110° et on laisse ensuite au bain-marie bouillant pendant une heure. On prend soin de recouvrir les erlenmeyers d'un couvercle de boîte de Pétri. En même temps, on prépare un ou plusieurs témoins dans lesquels on a remplacé les 20 ml de la solution à oxyder par 20 ml d'eaux distillée.

Au bout d'une heure de chauffage, on refroidit rapidement après avoir eu soin d'enlever les couvercles.

3° Appréciation de l'excès d'oxydant.

On ajoute ensuite 120 ml. d'eau distillée ; puis 3 à 5 ml d'iodure de potassium à 5 % si on utilise le bichromate N/20 et 7 à 10 ml si on utilise le bichromate N/10. On titre ensuite l'iode libéré par l'hyposulfite de soude N/20 ou N/10 en présence de quelques gouttes d'empois d'amidon.

Soient V et V' les nombres de ml d'hyposulfite versés respectivement dans le témoin et dans le dosage de l'acide tartrique. Le nombre de milliéquivalents d'acide tartrique contenus dans la prise d'essai utilisée pour l'oxydation est donné par les formules :

— 0,01 (V — V') dans le cas d'une solution d'hyposulfite de soude N/20,

et 0,02 (V — V') dans le cas d'une solution N/10.

Dans les cas où on utilise le sulfate ferreux, on opère de la façon suivante. Après refroidissement on ajoute 30 à 50 ml d'eau distillée puis on titre avec des solutions de sel de Mohr N/20 ou N/10 (9). Vers la fin du dosage, signalée par l'atténuation de la teinte jaune du bichromate de potassium, on ajoute une goutte d'orthophénantroline ferreuse en solution à 0,025 M (10), la teinte rouge de l'orthophénantroline disparaît en milieu contenant un excès de bichromate et réapparaît dès qu'il y a excès de sulfate ferreux. Le virage est très net.

Nous avons aussi essayé le sel de baryum de l'acide diphenylamine sulfonique en solution aqueuse à 0,5 % comme indicateur, mais il est nécessaire dans ce cas de complexer les sels ferriques par l'acide phosphorique si l'on veut un virage assez net.

C'est pourquoi bien que l'orthophénantroline ait un potentiel de virage un peu trop élevé (II) par rapport à celui du bichromate nous lui avons donné la préférence.

Dans tous les essais que nous avons faits, nous avons obtenus les mêmes résultats quels que soient les indicateurs et la méthode employés (voir tableau V).

TABLEAU V

Exemple de dosages d'acide tartrique en fonction de la méthode de réduction du bichromate de potassium employée. Résultats exprimés en milliéquivalents par litre.

Échantillons	1	2	3	4
Dosage iodométrique	60,5	71,5	51,5	56
Dosage de sulfate ferreux en présence d'orthophénantroline ferreuse	59,5	72	49,5	56

4° Précision de la méthode.

Sur une même solution d'acide tartrique pur, les résultats ne doivent pas différer de plus de 1/20^e de ml. de solution de bichromate de potassium. Étant donné qu'il est consommé dans la plupart des cas entre 8 à 15 ml de solution de bichromate N/20, l'écart entre les dosages devrait toujours être inférieur à 1 % et voisin de 0,5 %.

Comme le montrent les résultats que nous avons obtenus sur solutions pures d'acide tartrique, la réaction théorique s'est toujours trouvée vérifiée avec une erreur inférieure à 2 %.

Lorsque le pourcentage d'erreur est supérieur, il faut incriminer la présence d'impuretés réductrices dans l'acide sulfurique ou sur la verrerie.

5° Précautions à prendre au cours de ces dosages.

POLONOWSHY signale un certain nombre de causes d'erreurs provenant, soit des impuretés du bichromate de potassium, soit des poussières de l'air, soit du fait de la verrerie insuffisamment débarrassée des traces de matières organiques.

Nous avons utilisé du bichromate de potassium pur Prolabo et pur R. P. pour analyse. Nous n'avons pas eu de difficultés avec l'un ou l'autre de ces produits.

Afin d'obtenir une constance satisfaisante de nos résultats nous avons dû porter un soin particulier au nettoyage de la verrerie. Le matériel gravé était mis à tremper 24 heures dans le mélange sulfo-chromique, les erlenmeyers étaient lavés au mélange sulfo-chromique bouillant. Le tout était ensuite soigneusement rincé à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée, séché enfin à l'étuve.

De même, nous avons eu de nombreux ennuis avec l'acide sulfurique concentré pur Prolabo, lequel contenait très souvent des matières réductrices introduites lors du flaconnage ou au moment de l'ouverture du flacon L. THIVOLLE et G. SONTAG (12) signalent d'ailleurs ce fait et conseillent de faire bouillir l'acide sulfurique concentré. Nous avons été amenés à opérer de la même manière et estimons que l'acide utilisé doit être porté à l'ébullition pendant 1/4 d'heure avant son utilisation.

Nous estimons que l'acide sulfurique, pour être utilisé dans ces dosages, ne doit pas consommer plus de 1 ou 2/10 de ml de solution de bichromate N/20.

6° Application de la méthode au dosage de l'acide tartrique dans les moûts et les vins.

Compte tenu des quelques modifications de détails que nous avons apportées à la méthode d'isolement de l'acide tartrique sous forme de racémate de calcium décrite par PEYNAUD, nous avons effectué le dosage de l'acide tartrique par oxydation sulfo-chromique sur une solution A d'acide tartrique pur et sur une solution B contenant en outre de l'acide malique et de l'acide citrique (voir tableau VI).

TABLEAU VI

Dosage de l'acide tartrique dans des solutions simples

	Composition théorique par litre			Résultats du dosage	Rendement en %
	Ac. malique	Ac. tar.	Ac. Cit.		
Sol. A.....	—	38,6	—	37,9	98,18
Sol. B.....	87	38,6	19	39,8	103,1

TABLEAU VII

Dosage de l'acide tartrique dans les moûts et les vins

	Chiffre trouvé	Chiffre théorique	Rendement %
1) moût.....	85,6	—	—
moût dilué au 1/2 + 6,6			
még. d'acide tartrique	50,5	49,4	102,2
2) moût.....	115		
moût dilué au 1/2 + 20			
még. d'acide tartrique	80,25	77,5	103,5
3) moût.....	94		
moût dilué au 1/2 + 20			
még. d'acide tartrique	68,7	67	102,5
4) vin	30,6		
vin dilué au 1/2 + 6,6			
még. d'acide tartrique	21,3	21,9	97,2

Nous avons également effectué ce même dosage sur des moûts de raisin, puis sur les mêmes moûts dilués de moitié et additionnés de

6,6 et de 20 milliéquivalents d'acide tartrique par litre, enfin sur un vin puis sur le même vin dilué de moitié et additionné de 6,6 milliéquivalents d'acide tartrique par litre (voir tableau VII).

D'après ces tableaux, il apparaît que dans un milieu complexe contenant outre l'acide tartrique, les acides malique et citrique, les résultats obtenus sont un peu élevés. Mais, étant donné les difficultés des dosages d'acide tartrique dans les moûts et les vins, les écarts signalés ne diminuent en rien pour la pratique analytique la valeur de la méthode d'isolement décrite par PEYNAUD (7).

IV. — CONCLUSION

La méthode que nous avons décrite ci-dessus présente l'inconvénient d'être plus longue que celle utilisant le permanganate de potassium comme oxydant.

Elle présente par contre les avantages suivants :

— elle permet d'éviter dans les calculs l'introduction d'un coefficient, puisque la transformation de l'acide tartrique — sous l'influence du bichromate de potassium — en gaz carbonique et eau, est totale.

— quel que soit le procédé de dosage du bichromate de potassium en excès qui est utilisé, le virage indiquant la fin de la réaction est beaucoup plus net que celui que l'on a dans la méthode au permanganate. Le procédé iodométrique, peut être plus coûteux que celui du sulfate ferreux, nous a toujours donné satisfaction. La marche de la réaction y est beaucoup plus facile à suivre que dans l'autre cas. La coloration jaune due à l'iode étant en effet beaucoup plus intense que celle du bichromate de potassium, l'opérateur est mieux prévenu, de la fin du dosage.

Comparée à la méthode de POUX, elle demande moins de manipulations, et de ce fait n'est pas beaucoup plus longue.

D'autre part, elle présente l'avantage de ne nécessiter que trois mesures précises au lieu de cinq prévues dans la dite méthode.

Reçu pour publication le 16 décembre 1953.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) PATO. — *Bull. Off. Int. Vin*, 1944, **162**, p. 84.
- (2) POUX (Ch.) et Mlle OURNAC. — *Industries Agricoles et Alimentaires*, 66^e année, nov.-déc. 1949, p. 503.
- (3) TAUFEL (Kurt) et WAGNER (Carl). — *Z. Anal. Chem.*, 1925, **67**, 16.
- (4) POLONOWSKY (Michel). — *CR. Ac. Sc.* 1924, **178**, p. 576. *Mémoires de la Société de Biologie*, 1922, **86**, p. 853.
- (5) SEMICHON et FLANZY. — *CR. Ac. Sc.*, 1932, **194**, p. 1827 et 2063.
- (6) FLANZY. — *Ann. Fals. Fraudes*, 1935, p. 260.

- (7) PEYNAUD. — *Ann. Fals. Fraudes*, 1936, p. 260.
 - (8) POUX (Ch.). — *Ann. Fals. Fraudes*, 1949, p. 439.
 - (9) DENIGES. — *Précis de chimie analytique* 4^e édition 1913, p. 594, Maloine Editeur.
 - (10) CHARLOT (G.) et BEZIER (D.). — *Méthodes modernes d'analyse quantitative minérale*. 2^e édition, p. 56, Masson Editeur.
 - (11) CHARLOT (G.) et BEZIER (D.). — p. 57.
 - (12) THIVOLLE (L.) et SONTAG (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, 21.
-

DOCUMENTATION

ACTIVITÉ PHYSIOLOGIQUE DU VIN ET DU RAISIN ET LE RÔLE DE LEURS COMPOSANTS POLYPHÉNOLIQUES D'APRÈS LES RÉCENTS TRAVAUX

PAR

LÉONCE DEIBNER

Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie, la Cidrerie et les Jus de fruits
Narbonne

I. — Introduction.

II. — Recherches sur les propriétés diététiques et physiologiques des vins.

- A. — Expérimentation sur les animaux.
- B. — Expérimentation sur l'homme.
- C. — Recherches sur l'action bactéricide des vins rouges.

III. — Recherches sur le rôle physiologique et pharmacodynamique de certaines substances organiques du vin et du raisin.

- A. — Acides organiques.
- B. — Substances polyphénoliques.
 - a) Nature chimique du complexe tannique du raisin et du vin.
 - b) Propriétés physiologiques des colorants et des substances tanniques du raisin.
- 1° Nature des substances douées d'une activité pharmacodynamique vis-à-vis de la résistance capillaire.
- 2° Étude de l'activité pharmacodynamique des colorants et des composés tanniques du raisin et du vin.
 - 1) Généralités.
 - 2) Propriétés vitaminiques P des substances tanniques et colorantes du raisin.
 - 3) Activité vitaminique P des différentes catéchines et de leurs dérivés.
 - 4) Activité vitaminique P des différents types de vins.

IV. — Conclusion.

I. — INTRODUCTION

Les propriétés diététiques et médicinales des vins sont connues depuis plusieurs millénaires ; les opinions favorables des médecins, égyptiens, hindous, juifs, appartenant à différentes époques de l'antiquité, sont extrêmement nombreuses. HIPPOCRATE, médecin et habile praticien, a souligné d'une façon particulière l'importance des propriétés physiologiques et médicinales des vins.

D'après ASCLEPIADE, un autre médecin célèbre gréco-romain, connu pour sa notoriété dans les questions de la médecine diététique, « la puissance des dieux est à peine égale à l'utilité des vins », opinion qui, d'ailleurs, a été conforme à la légende sur la nature divine de ces derniers (I-a) GALIEN, médecin, appartenant déjà à notre ère, a vanté, à son tour, leurs qualités alimentaires et toniques. Grâce aux nombreux résultats, issus de l'expérimentation d'une pléiade de médecins et de physiologues, l'œnothérapie constitue de nos jours une branche spécialisée de la médecine.

Quelles sont donc les raisons qui ont conféré aux vins le privilège d'être considéré, non seulement comme boissons alcooliques, mais également comme liquides à propriétés pharmacodynamiques ? Comme nous verrons tout à l'heure, les expériences exécutées sur l'homme et les animaux ont débuté par l'étude de l'action générale des vins et des solutions alcooliques simples ; cette méthode ne donnait, toutefois, aucune idée exacte sur les causes des phénomènes observés. Les recherches sur la différenciation des substances responsables de l'effet pharmacologique des vins, quoique rares en raison des difficultés qu'elles comportent, sont, toutefois, seules capables de résoudre le problème posé. Nous commencerons notre exposé par une courte revue des expériences comprenant l'emploi du vin tel quel.

II. — RECHERCHES SUR LES PROPRIÉTÉS DIÉTÉTIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DU VIN.

L'expérimentation en vue d'étudier les propriétés diététiques et physiologiques du vin a été faite sur les animaux et sur l'homme.

A. — Expérimentation sur les animaux.

De nombreuses expériences sur les animaux ont démontré l'effet favorable de l'emploi du vin dans l'alimentation des animaux. En 1891 STRASMANN a constaté l'augmentation notable du poids des chiens grâce à l'introduction du vin dans leur alimentation (2). ROOS, en 1900, a démontré la valeur alimentaire du vin sur les cobayes et des solutions alcooliques diluées sur les poissons.

Il est intéressant de noter que les cobayes expérimentés ont augmenté de poids et étaient plus prolifiques (*op. cit.* (2) p. 43). (3).

L'action favorable du vin a été constaté également dans la pratique vétérinaire.

L'ouvrage de DOUGNAC, (*op. cit.* (1)) ainsi que le mémoire l'Alquier (4) citent d'autres exemples fort instructifs.

Nous nous bornerons à signaler les résultats des expériences plus récentes, effectuées sur les chiens par TCHERBAKOV (*op. cit.* (2) p. 36-37). Ce professeur a étudié d'abord l'influence de quelques vins d'Arménie sur le fonctionnement des reins, en utilisant la méthode de l'expérimentation physiologique. Les chiens possédaient une fistule de l'estomac et des fistules des deux uretères.

Comme on le sait, les indices de l'activité des reins sont la grandeur de la diurèse, la teneur des chlorures dans l'urine, sa densité et son pH. Les essais comparatifs ont été effectués avec le vin sec (sorte Tchilar) et avec mistelle. Le premier ne modifie pas la courbe normale de la diurèse, il provoque la diminution du pH ; par contre, la mistelle, possédant une forte action diurétique,

détruit l'allure régulière de la diurèse, augmente la densité de l'urine, la teneur de l'acide urique ; le pH est légèrement abaissé. Les mêmes chiens ont servi pour les études concernant l'action du vin sur l'écorce du cerveau.

On déterminait les réflexes conditionnels de l'activité des reins. Le vin du type Porto, introduit directement dans l'estomac, provoquait l'augmentation de l'effet excitatif, lié à un signal positif ; dans les mêmes conditions le signal de freinage correspondait à l'augmentation de l'intensité du freinage. Le vin de Porto porte l'excitabilité de l'écorce du cerveau à un degré plus grand par rapport à l'essai de contrôle ce qui correspond en même temps à l'augmentation de la diurèse. Lors de l'emploi du signal de freinage, le vin de Porto, utilisé dans les mêmes conditions, détermine un plus grand freinage.

Dans ces conditions le vin peut-être considéré aussi comme aliment du système nerveux.

Signalons, dans un autre ordre d'idées, que KLIEW et GILLISSEN (5) ont observé les effets du vin dans les cas d'empoisonnement à la toxine diphtérique, expérimentée sur des cobayes. Le vin, injecté simultanément avec la toxine, neutralise son action par son acidité. D'autre part, GILLISSEN (6) a étudié, sur des cobayes, l'influence du vin sur les capsules surrénales ; il conclut que le vin provoque une sécrétion plus active d'adrénaline.

Tout dernièrement FLANZY et CAUSERET (7), en poursuivant les expériences de PARANDEL et celles de ROUGIÉ, ont confirmé la différence d'action du vin et de l'alcool sur les jeunes rats, due à la présence, dans le vin d'antidotes de l'alcool. Les mêmes auteurs et leurs collaborateurs (7-b) ont fait ressortir la répercussion des pratiques œnologiques sur l'activité biologique des vins.

B. — Expérimentation sur l'homme.

Il existe de nombreux témoignages médicaux, concernant l'influence bien-faisante du vin sur l'organisme humain ; l'ouvrage de DOUGNAC, le traité de Loebenstein (*op. cit.* (1)) et le mémoire d'Alquier (*op. cit.* (4)) en donnent de nombreux exemples.

Nous citerons seulement une observation récente, faite à l'université de Stanford, en Amérique, que le vin rouge contient une substance, d'ailleurs, inconnue, qui constitue un puissant stimulant de l'appétit (8). Il existe pour l'homme une relation entre l'appétit et la capacité de détecter les arômes ; l'alcool par exemple, appartient à la classe des substances qui diminuent ou détruisent à la fois la sensibilité aux arômes et l'appétit ; par contre, le vin les stimule. GOETZE, auteur de ces études sur l'action stimulante du vin rouge sur l'appétit considère que le principe actif, encore ni identifié, ni isolé, est apparenté aux tanins ou aux acides organiques ; ce point de vue s'accorde bien avec les conceptions ou avec les expériences récentes suivant lesquelles le vin apporte à l'organisme des corps à haute aptitude réactionnelles et pharmacodynamique.

C. — Recherches sur l'action bactéricide des vins rouges.

Les études modernes des facteurs qui conditionnent la vertu bactéricide du vin méritent d'être mentionnées. DRACZYNSKI (9) s'est penchée sur l'étude des propriétés bactéricides du vin ; l'auteur arrive à la conclusion que ces facteurs se réduisent essentiellement à deux : l'alcool et les acides.

Les recherches sur l'action bactéricide des vins rouges, effectuées par

MASQUELIER et M^{me} JENSEN (10), ont démontré le rôle important joué par les colorants dans ce phénomène, surtout par l'œnidol. La découverte d'une substance antibiotique dans les vins rouges, fermentés pendant deux à six semaines, a été faite tout récemment par GARDNER (11). Toutefois, en comparaison avec la pénicilline l'effet bactéricide est faible, peut-être en raison de l'état brut de la substance isolée.

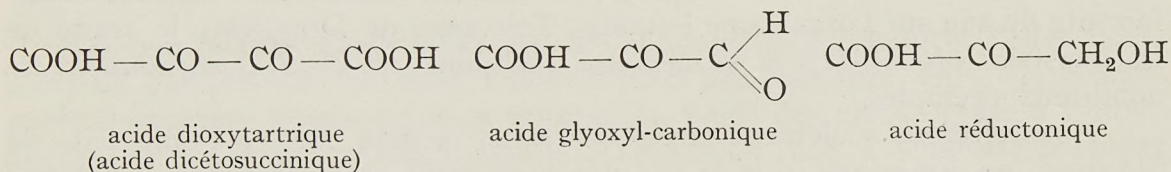
III. — RECHERCHES SUR LE RÔLE PHYSIOLOGIQUE DE CERTAINES SUBSTANCES ORGANIQUES DU VIN ET DU RAISIN.

Le vin apporte des quantités non négligeables d'éléments nutritifs tels que les vitamines, certains biocatalyseurs métalliques, des aminoacides, acides organiques et substances polyphénoliques comme catéchines et leurs dérivés. Nous nous bornerons à traiter dans ce qui suit le rôle des acides organiques et, en particulier, des substances polyphénoliques qui seules ont été utilisées pour les essais biologiques.

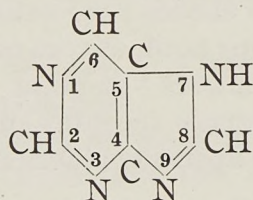
A. — Acides organiques.

Le vin rouge est reconnu empiriquement depuis longtemps comme tonique et reconstituant. On sait, d'autre part, que tous les acides organiques du vin ont une grande importance biologique. Tout d'abord il faut parler de l'acide tartrique qui, par une aptitude à donner les acides dioxymaléique et glyoxylcarbonique, joue un rôle considérable.

D'après GENEVOIS et RIBÉREAU-GAYON (12), les vins vieux accumulent de l'acide dioxytartrique, de l'acide glyoxylcarbonique et de l'acide réductonique issu du précédent par réduction.



L'acide glyoxylcarbonique se prête facilement, étant une molécule active, à la synthèse du noyau purique, dont le représentant le plus caractéristique est l'adénine (6-amino-purine) ; ce dernier, d'ailleurs, peut se former seulement en milieu réducteur.

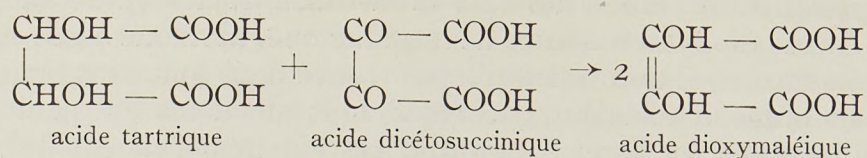


Purine hypothétique

Tout récemment RODOPOULO (13) a apporté une nouvelle contribution à l'étude des propriétés réductrices de l'acide tartrique, de l'acide dioxymaléique et de ses dérivés.

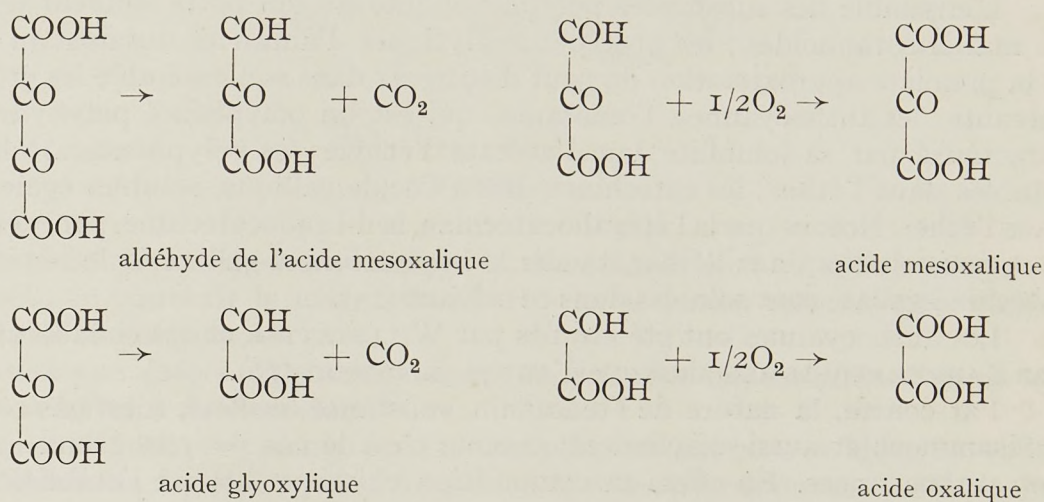
Les substances suivantes ont été trouvées dans les vins aérés : les acides dioxymaléique, dicétosuccinique, glyoxylique, oxalique et le glyoxal ; tous ces composés sont liés génétiquement entre eux. Dans les conditions anaérobies

l'acide dicétosuccinique, formé en présence d'oxygène, réagit sur l'acide tartrique, suivant la réaction ci-dessous pour donner naissance à l'acide dioxymaléique.



Les vins vieux, conservés à l'abri de l'air, sont caractérisés par leur goût et leur arôme agréables grâce à la présence de l'acide dioxymaléique ; l'accumulation de ce dernier s'accompagne d'une baisse de potentiel d'oxydo-réduction.

L'aération du vin favorise la décarboxylation de l'acide dicétosuccinique et son oxydation en acide glyoxylique qui a son tour s'oxyde jusqu'à l'acide oxalique.



Les vins fortement aérés ont un goût dur dû à la formation de l'acide oxalique.

Les vins vieux ou les vins préparés en présence de petites quantités d'oxygène sont caractérisés par la présence de l'acide dioxymaléique.

Au point de vue œno-chimique l'importance de ces deux acides est donc considérable.

Les autres acides organiques du vin jouent un rôle également important si l'on se rappelle que les acides citrique, lactique, succinique sont des constituants normaux du sang ; en particulier, l'acide succinique peut-être considéré comme stimulant de la respiration cellulaire à la façon d'un catalyseur. D'autre part, les acides malique et acétique sont facilement brûlés dans l'organisme. (*op. cit.* (12) p. 125).

Après avoir noté les points intéressants concernant le rôle physiologique des acides organiques, nous pouvons regretter que l'étude systématique de leur action et surtout de celle des dérivés de l'acide tartrique n'ait pas fait l'objet de recherches biologiques. Or, il serait extrêmement instructif de voir, par exemple, la signification physiologique des acides dicétosuccinique et dioxymaléique et des substances qui apparaissent à la fin de leur évolution.

D'après GÉNEVOIS et RIBÉREAU-GAYON (*op. cit.* (12) p. 124), le système, constitué par l'ensemble acide ascorbique-acide-dioxymaléique, a, sans doute, une valeur biologique supérieure à l'acide ascorbique seul ; d'ailleurs, cette dernière se trouve dans le vin en petites quantités.

Cette étude est d'autant plus importante que la maturation des vins est liée, dans une certaine mesure, au vieillissement de l'acide tartrique.

En appliquant à l'étude des vins sa méthode de dosage de l'acide ascorbique, de l'acide dioxytartrique et de la réductone, méthode basée sur la réaction de la tartrazine, BARAUD (14) n'a pas trouvé dans huit vins blancs étudiés ni acide ascorbique ni acide dioxymaléique, tout au moins en quantité dépassant le milligramme par litre. Par contre, ces vins renfermaient des quantités importantes et parfois considérables de substance R, quantités qui étaient, en général, en relation avec le taux du sucre du vin. Cette substance R ne s'identifie pas avec la réductone. La présence d'un dérivé inconnu des glucides dans les vins pose ainsi un autre problème à résoudre.

B. — Substances polyphénoliques.

L'ensemble des substances polyphénoliques du vin porte souvent le nom de matières tannoïdes ; les procédés analytiques d'antan les dosaient en bloc. A la première approximation on peut distinguer dans son ensemble les groupes suivants : les anthocyanes, l'œnotanin, qui est un polyphénol polyhydrique, caractérisé par sa solubilité dans l'acétate d'éthyle ; les polyphénolcatechines, solubles dans l'éther ; les catéchines, liés à l'acide gallique, solubles également dans l'éther. Notons que la l'épigallocatechine, la d-l gallocatechine, par exemple, sont peu solubles dans l'éther, tandis le l-épicatechine-gallate et le l-épigallocatechine-gallate sont solubles dans ce solvant (15).

Les anthocyanes ont été étudiés par WILLSTATTER et ses collaborateurs, par KARRER et WIDMER ainsi que d'autres chercheurs (16).

Par contre, la nature de l'œnotanin, substance incolore, n'est pas connue suffisamment et aussi exactement, comme c'est le cas pour la grande partie des anthocyanes. En effet, sa composition chimique attend l'établissement d'un bilan complet ne comportant aucune objection.

a) *Nature chimique du complexe tannique du raisin et du vin.*

Il y a quelques années la nature chimique du œnotanin constituait l'objet des controverses et des opinions.

HEISE (17) considère l'œnotanin comme complexe de trois substances, dont l'une est comparable à l'acide gallique. PETRI (18) a établi que c'est un glucoside contenant 2,4 % de glucose (glucoside du catéchol ?) PONTE et GUALDI (19) classent l'œnotanin dans le groupe des catéchines. RIBEREAU-GAYON et MAURIÉ (20) ont constaté que les composés phénoliques du vin sont chimiquement très différents de l'acide tannique. (tanin à l'éther).

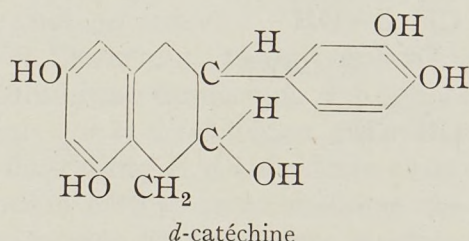
D'après NÈGRE (21) l'œnotanin paraît-être un hétéroside comprenant dans sa molécule de l'acide protocatéchique et de tanin pyrogallique ; si le vin contient du tanin pyrogallique, à côté des tanins pyrocathéchiques et des polyphénols non tanins, ce n'est qu'en proportions très faibles ; l'auteur, n'a pu d'ailleurs, le caractériser.

POLITOVA-SOVZENKO (22) a établi que le tanin des rafles du raisin Agadan contient 19,4 % d'acide gallique lié à la manière de depsides.

DOURMISCHIDZÉ (23) indique également qu'à côté du tanin catéchique, il existe des fractions renfermant cet acide. Cet auteur a utilisé des réactions de STIASNY (24) et de FISCHER-BERGMANN (25) suivant le procédé de KOURSANOV (26). Le réactif de STIASNY (formol + acide chlorhydrique) précipite les

catéchines simples et les tanins condensés catéchiques ; le réactif de FISCHER-BERGMANN (la solution alcoolique d'acétate de potassium à 5 %) précipite, en solution alcoolique, les gallo-tanins. Finalement DOUZMISCHIDZÉ a constaté que les tannoïdes des feuilles de la vigne, des pellicules des pépins et des rafles de raisin contiennent 15-28 % des tanins mixtes, c'est-à-dire, des catéchines liées à l'acide gallique. En effet, l'hydrolyse des tannoïdes des pépins a libéré de l'acide gallique ; également, la fraction des polyphénolcatéchines donne la réaction avec le cyanure de potassium, caractéristique pour l'acide gallique. Les composants principaux d'œnotanin appartiennent à la classe des tanins catéchiques (85-% — 72 %).

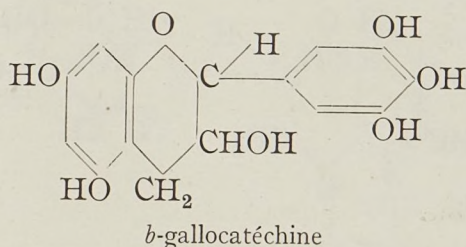
En 1950, DOORMISCHIDZÉ (27) a isolé et a identifié d'une manière rigoureuse le catéchine présent dans les différentes parties de la grappe des cépages rouges et blancs.



Dans les pépins du raisin vert 70 % d'œnotanin sont constitués par le *d*-catéchol ; au cours de la maturation 70 % de ce dernier subissent des transformations chimiques.

GENÉVOIS (28) a signalé également la présence des catéchines dans les raisins et les vins du Bordelais.

En continuant ses recherches DOORMISCHIDZÉ (29) isole et identifie, dans les feuilles de la vigne, les rafles, les pellicules et les pépins du raisins, la *l*-gallo catéchine.

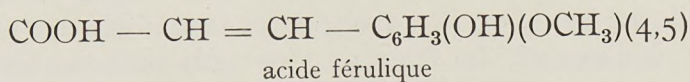
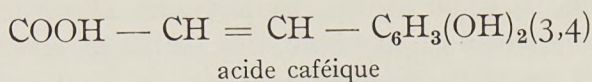


Les pépins du raisin vert, contiennent 20-23 % de ce composé ; à la maturation du raisin sa teneur atteint 50 %. Il se peut que la *l*-gallo catéchine se forme à partir du *d*-catéchol par oxydation. Les tannoïdes du raisin contiennent, également, d'autres composés tels que les *d*-*l* ou *d*-gallo catéchines. Il se peut que la gallo catéchine soit à la base de la formation d'œnidine.

Nous pouvons considérer actuellement que l'œnotanin est constitué par le mélange des catéchines, des gallo catéchines et de leurs produits de condensation, sans oublier la présence possible des polyphénols simples et de l'acide galliques, libre ou sous forme de depsides. Cette composition est comparable à celle du tannin des feuilles du thé, de sorte que l'étude de l'œnotanin est liée aux recherches sur les tannoïdes du thé.

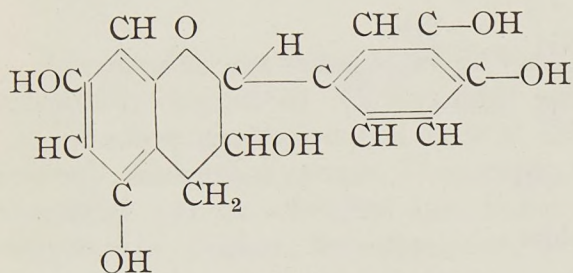
Il existe dans les raisins et les vins jeunes d'autres substances polyphénoliques telles que les acides caféïque et férulique ; GENEVOIS (30) a signalé

leur présence dans les divers cépages Bordelais ; d'ailleurs, ces acides sont plus abondants dans les raisins rouges que dans les raisins blancs.

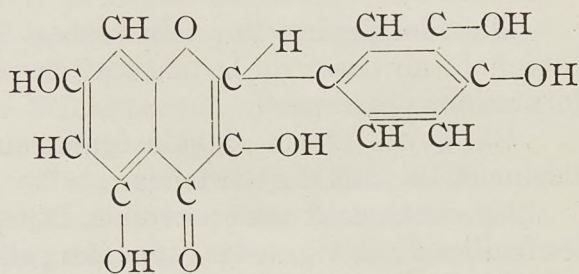


b) *Propriétés physiologiques des colorants et des substances tanniques du raisin.*

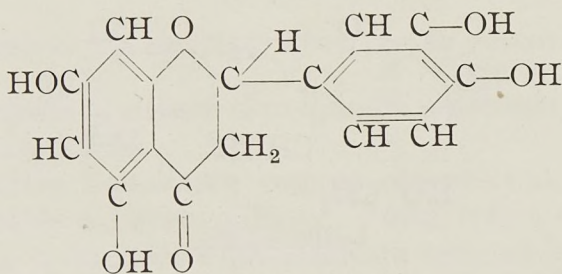
Les propriétés biologiques des colorants et des substances tanniques du type des catéchines, flavonols et des flavonones ont fait l'objet de recherches surtout au point de vue de leur propriétés vitaminiques P.



catéchine



flavonol

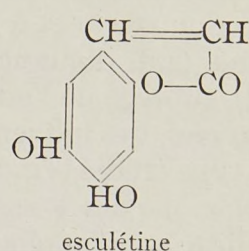
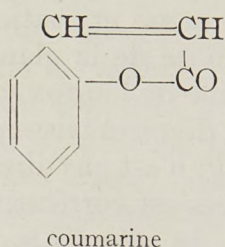
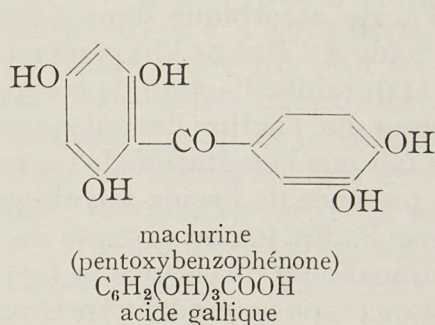


flavannone

1° NATURE DES SUBSTANCES DOUÉES D'UNE ACTIVITÉ PHARMACODYNAMIQUE VIS-A-VIS DE LA RÉSISTANCE CAPILLAIRE.

En, 1936 ; SZENT-GYORGYI et ses collaborateurs (31) mettaient en évidence le pouvoir, que possèdent les extraits de citron et de paprika, d'accroître la résistance des vaisseaux capillaires et de régler leur perméabilité aux protéines ; la substance responsable était désignée sur le nom de vitamine P (Permeabilitäts Vitamine). SZENT-GYORGYI envisageait la vitamine P comme une flavanone. Les recherches, effectuées par différents auteurs (32) ont fait disparaître la notion d'une spécificité strictement liée à la structure flavonique. Cette activité P appartient à des hydroflavones et à leurs hétérosides, à des hydroxyflavannones, à des hydroxyflavonols, à des cathéchines et des cyanidols ainsi qu'à

des composés phénoliques plus simples tels que la maclurine, coumarine, esculetine et, peut-être l'acide gallique.(33).

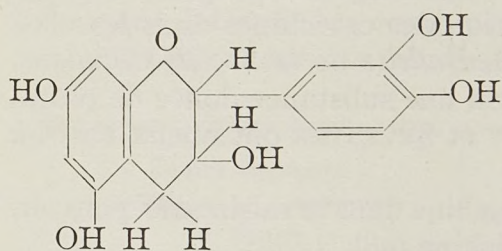


L'activité biologique de ces substances est liée à leur nature polyphénolique. D'autre part, l'activité-P peut-être spécifique, étant présente chez un isomère et étant absente chez un autre.

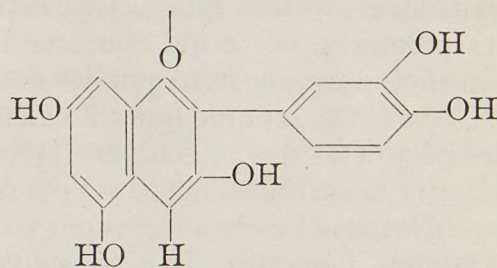
LAVOLLAY, PARROT et SEVESTRE (34) ont montré que la d-catéchine ne possède pas l'activité vitaminique tandis que son épimère (L-épicatéchine) est actif. Ces auteurs ont admis que la d-catéchine, chauffée en présence d'une solution saturée de chlorure de sodium et d'anhydride carbonique, forme la d-épicatéchine. Le produit obtenu n'était qu'un mélange des isomères ; la d-épicatéchine, si elle pouvait se former pendant cette réaction, était loin d'être identifiée.

Remarquons que NIERENSTEIN a signalé que les procédés d'épimérisation indiquée par FREUDENBERG, ne sont pas toujours valables (35).

Les d-catéchine et l-épicatéchines s'oxydent facilement en cyanidol ; cette réaction a été découverte par APPEL et ROBINSON en 1935 (36). FINKE (37) a indiqué que la coloration rouge violacé se prête bien aux mesures colorimétriques. LAVALLAY et VIGNEAU ont mis au point une technique directe, évitant le blocage des groupements phénoliques sous forme de dérivés méthyliques (38).



(3, 5, 7, 3', 4', pentahydroxyphénylchromane
ou pentahydroxyflavanne)



LAVOLLAY, PARROT, et SEVESTRE ont signalé en 1934 que les anthocyanidols et leurs glucides possèdent également l'activité vitaminique P ; toutefois, les résultats obtenus ne sont pas publiés (39).

Il y a lieu de remarquer qu'il existe bien d'autres corps qui influent sur la résistance et la perméabilité capillaires, comme les acides aminés, guanidine, thiourée, sulfocyanures et, même, à hautes doses la vitamine C elle-même (40). La vitamine P ne présente pas donc une très grande spécificité. Cela laisse à penser que les propriétés, attribuées aux diverses substances, correspondent à une action purement pharmacodynamique ; d'après JAVILLIER, le mot vitamine serait déplacé (41). A présent on considère les corps de structure flavonique comme des substances douées d'une activité pharmacodynamique commune. Voyons maintenant comment se manifeste cette activité.

L'action biologique de la vitamine P se manifeste dans l'augmentation de la résistance des parois des capillaires ; ensuite cette vitamine contribue à l'accumulation et à la meilleure utilisation de l'acide ascorbique dans l'organisme (42), diminue l'activité de la glande thyroïde à l'état de l'hypertrophie (43), protège de l'adrénaline de l'autoxydation (44), inhibe l'action de certains enzymes. Ces influences si diverses laissent supposer que l'action des substances du type étudié (vitamine P) n'est pas directe. Le fait que l'exaltation de l'action biologique des P-substances est corrélative à la présence de l'acide ascorbique, facilite la compréhension du rôle de la vitamine P. En tenant compte de la liaison existante entre le comportement de l'adrénaline et de la tyrosine (45) et de la capacité de l'oxydo--réduction des P-substances, on peut admettre la participation de ces substances dans le système complexe des réactions oxydo-réductrices de l'organisme. Il est donc nécessaire d'entreprendre des études comparatives de l'activité biologiques des substances pures ; or, les recherches sont malaisées en raison des difficultés de la séparation des catéchines et des flavones.

2^o ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ PHARMACODYNAMIQUE DES COLORANTS ET DES COMPOSÉS TANNIQUES DU RAISIN ET DU VIN

1) Généralités.

En 1944 LAVALLOY et SEVESTRE (46) ont démontré que le vin rouge possède l'activité vitaminique P. Les essais ont été effectués sur des cobayes, en leur injectant soit du vin, privé de son alcool, soit de l'extrait aqueux, obtenu par l'épuisement du vin par l'éther acétique ; les essais par injections ont été également exécutés. Dans tous les cas on a établi que le vin possède de précieuses propriétés vis-à-vis des capillaires.

Les auteurs ont attribué l'activité pharmacodynamique constatée aux catéchines. Notons que A. GAUTHIER doit être considéré comme premier parmi les pionniers, en ce qui concerne l'identification des catéchines dans les vins. En effet, dans une note, publiée en 1877 dans le *Bulletin de la Société Chimique*, A. GAUTHIER indique que « il existe dans le vin une substance douée de toutes les propriétés des catéchines » (47). LAVOLLAY et SEVESTRE ont mieux réussi à séparer et surtout à identifier ces dernières.

Notons que ces auteurs ont trouvé la catéchine dans le raisin sans pouvoir, toutefois, démontrer la présence de d-épicatéchine (48).

En 1950 KOURSANOV, BOUKINE, POVOLOTZKAYA et ZAPROMETOV (49) ont démontré que le tannin du thé (mélange de catéchines et de leurs esthers galliques) et la l-épicatéchine possède l'activité pharmacodynamique sur les capillaires, favorisent l'accumulation de l'acide ascorbique dans l'organisme des animaux en les protégeant ainsi des effets du scorbut. Les auteurs cités ont extrait un tannin amorphe des feuilles vertes du thé ; ce tanin est un mélange des catéchines et de leurs esthers galliques. A partir des feuilles vertes on a isolé la l-épicatéchine à l'état cristallisé. Une autre préparation du tanin a été obtenue à partir du thé noir. Ces préparations tanniques, ainsi que la l-épicatéchine, ont été administrées aux souris blanches par voie intra-musculaire en raison de 1-3 mg. Dans tous les cas la résistance capillaire, mesurée dans les poumons, a été en augmentation sensible ; le tanin des feuilles vertes a été le plus actif. D'autres essais ont démontré que la l-épicatéchine et les deux tanins expérimentés favorisent l'accumulation de l'acide ascorbique dans l'organisme, en le protégeant de l'effet du scorbut. Trois groupes de souris

étaient à la même diète ; le premier groupe servait de contrôle ; le deuxième recevait en plus 10 mg d'acide ascorbique par jour, le troisième 10 mg de cet acide plus de 1 à 3 mg de tanin ou de l'épicatéchine. La durée des essais était de trente jours. Au bout de 17 jours les animaux du premier groupe étaient morts des suites du scorbut ; ceux du deuxième avaient des symptômes scorbutiques ; enfin le troisième groupe ne décelait aucune trace de maladie, et montrait l'accumulation de l'acide ascorbique, beaucoup plus marqué pour le tanin des feuilles vertes. Ce regain de l'activité s'expliquait, d'après les auteurs, par la présence possible de gallo-catéchine ; la l-épicatéchine était moins active. Ce point de vue s'avéra exact pour l'œnotanin.

2) *Propriétés vitaminiques P des substances tanniques et colorantes du raisin.*

DOUMISCHIDZÉ et BOUKINE (50) ont utilisé la technique décrite plus haut de KOURSANOV et de ses collaborateurs (*op. cit.* (49)), pour l'étude des propriétés physiologiques des substances tanniques et colorantes du raisin. Nous savons déjà que la d-catéchine et la l-gallocatéchine se trouvent dans toutes les parties solides du raisin, dans la pellicule, rafles et pépins ; l'œnidine se trouve dans la pellicule des raisins rouges. Les tanins amorphes, obtenus à partir des différentes parties du raisin (rafles, pellicules, pépins), ont, en principe, la même composition ; ce sont des mélanges de catéchines et de leurs esthers galliques (51) ; leurs poids moléculaires oscillent entre 370-550, les hydroxyles phlorogluciniques de 12, 2 % à 15, 7 % et les hydroxyles pyrogalliques de 8,3 à 10, 1 %.

Les auteurs ont préparé trois échantillons du tanin amorphe en partant des pépins du raisin rouge SAPERAVI. Les tanins I et III ont été extraits des pépins du raisin mûr, riche en l-gallocatéchine ; par contre, le tanin II a été préparé à partir des pépins du raisin vert, contenant de d-catéchine (70 % des substances tanniques). D'autre part, les tanins I et II ont été extraits par l'acétate d'éthyle, le tanin III par l'alcool éthylique ce qui a favorisé son oxydation partielle et à déterminé sa couleur brune.

Le tableau suivant montre les résultats de l'analyse de ces tanins amorphes.

Tanins amorphes			Poids moléculaire	Carbone %	Hydrogène %	Azote %	Hydroxyles		Coefficient d'oxydabilité
Désignation	Nature de la matière première	Solvant utilisé pour l'extraction					Phloro- glucini- ques %	Pyrogal- liques %	
I	Pépins (raisins mûrs)	acétate d'éthyle	500	59,00	4,80	0	12,2	10,3	0,00510
II	Pépins (raisins verts)	idem	440	59,75	4,94	0	17,7	9,2	0,00480
III	Pépins (raisins mûrs)	alcool éthylique	—	—	—	0	7,5	6,0	0,00959

Comme on le voit le tanin 3 est caractérisé son état plus prononcé de condensation par rapport à I, malgré leur provenance semblable. Remarquons que les hydroxyles phlorogluciniques ont été déterminés, suivant la méthode colori-

métrique de KOURSANOV (52) ; quant aux hydroxyles pyrogalliques, ils ont été dosés par la méthode de KOURSANOV et ZAPROMETOV qui utilise la réaction de sulfate ferreux, en présence du sel de Seignette, avec les substances contenant les hydroxyles pyrogalliques ou pyrocatéchiques (53).

Lors des essais biologiques sur les cobayes, préalablement sevrés à l'aide de nourriture riche en acide ascorbiques, leur diète se composait d'amidon de caséine, de sels et d'avoine ; ces animaux recevaient journellement les vitamines B¹, B², P P., A et D. Les cobayes étaient divisés en 8 groupes ; les 6 premiers groupes recevaient par jour 10 mg d'acide ascorbique et 1 mg d'une substance expérimentée (l-galloatéchine, d-catéchine, œnidine, tanins I, II, III ; la diète du groupe 7 comprenait 10 mg d'acide ascorbique ; ce groupe constituait le contrôle positif ; le groupe 8 servait comme contrôle négatif, car les animaux recevaient seulement la nourriture de base. La durée des essais était de 30 jours. Après la mise à mort des cobayes, on cherchait dans leurs organes les indices du scorbut et on y dosait l'acide ascorbique.

Le tableau suivant donne les résultats moyens de chaque groupe. Augmentation de poids et teneur en acide ascorbique dans les organes des cobayes en mg en tenant compte de l'humidité naturelle.

Préparations utilisées	Nombre d'animaux	Augmentation du poids g jour	Teneur en acide ascorbique mg %				
			muscles	foie	rate	reins	glandes surrénales
L-galloatéchine	5	2,0	3,0	9,0	49,4	6,7	117,5
D-catéchine.....	6	2,2	3,7	6,3	36,6	6,6	73,5
Œnidine	5	2,8	2,8	6,6	25,6	4,6	71,9
Tanin I	5	2,6	3,5	8,7	32,3	6,6	89,5
Tanin II.....	5	2,8	3,0	6,2	23,6	5,5	77,0
Tanin III.....	6	2,3	2,2	6,8	25,4	5,3	59,9
Contrôle positif.....	5	2,3	2,6	5,1	22,8	5,4	58,1
Contrôle négatif.....	6	— 3,3	2,2	3,5	5,5	2,5	12,5

Les cobayes du contrôle négatif ont péri au bout de 24-26 jours avec les indices nets du scorbut. En ce qui concerne le taux de l'accumulation de l'acide ascorbique, les animaux traités avec la l-galloatéchine, ont fourni les meilleurs résultats ; ensuite se placent les groupes du tanin I, de la d-catéchine et du tanin II ; l'œnidine n'a guère montré d'activité ; le tanin III a été inactif. Remarquons que l'augmentation du poids n'est pas en corrélation avec l'accumulation de l'acide ascorbique, sauf le groupe du contrôle négatif. A ce propos il y a lieu de signaler, que l'on ne peut pas faire de conclusion sur l'activité anti-scorbutique des substances en sa basant sur la dynamique du poids. L'appréciation de cette activité doit se baser sur l'analyse histologique des tissus et, en particulier, des dents des cobayes (54).

Les résultats obtenus sont illustrés par un autre tableau donnant en pour 100 les teneurs d'acide ascorbique dans la rate et les glandes surrénales, organes caractérisés par leur capacité d'accumulation de cet acide.

Teneur relative d'acide ascorbique dans les organes en pour % par rapport au groupe du contrôle positif.

Organes	l-galocatéchine	d-catéchine	Cœnidine	Tanin		
				I	II	III
Rate.....	216,6	160,6	112,2	141,6	103,3	111,4
Glandes surrénales	202,0	126,4	123,6	153,9	132,4	101,4

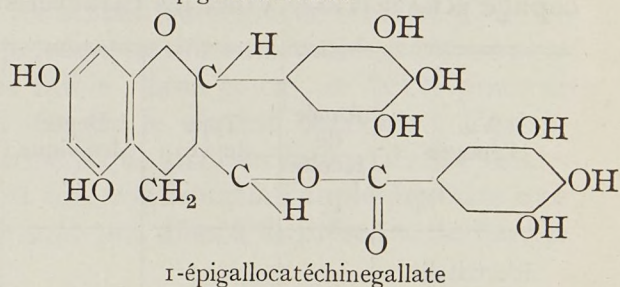
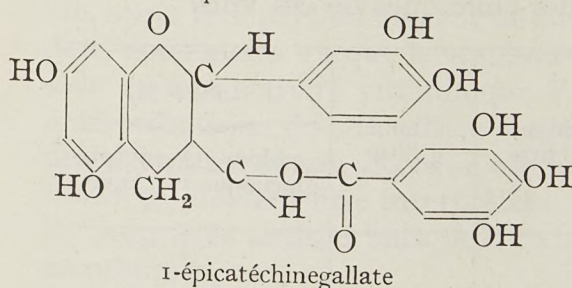
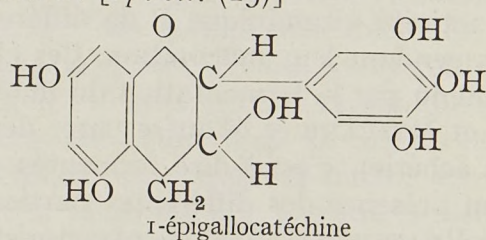
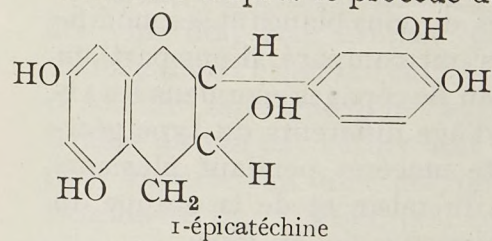
La différence dans l'activité des substances utilisées est liée à leur structure. En effet, la gallocatéchine possède trois hydroxyles phénoliques libres dans le noyau phénylique latéral, la d-catéchine seulement deux et œnidine un. Quant aux tanins amorphes, le tanin I est plus riche en hydroxyles pyrogalliques que l'échantillon II ; la condensation oxydante a diminué tellement le nombre d'hydroxyles dans le tanin III que ce dernier est devenu inactif. Rappelons que ce tanin a été extrait avec de l'alcool éthylique ce qui a favorisé son oxydation partielle. Ce phénomène est à retenir lors de l'appréciation des différents procédés de l'élaboration du vin ; sans doute, un grand excès d'oxygène serait défavorable à l'activité biologique des substances polyphénoliques catéchiques.

Signalons que MASQUELIER et M^{me} JENSEN (55) ont étudié également l'action vitaminique P de la fraction anthocyanique brute d'un vin rouge. Étant donné l'impureté de la substance isolée, il n'est pas possible d'attribuer son activité à l'œnidol seul, qui, comme nous l'avons vu, est faiblement actif.

3) *Activité vitaminique P des différentes catéchines et de leurs dérivés.*

Nous avons vu précédemment (*op. cit.* (27) et (29)) que le raisin contient la d-catéchine physiologiquement peu active, la l-gallocatéchine active et, éventuellement, les dl ou d-gallocatéchines, non isolées pour le moment.

Or, d'après les récents travaux de KOURSANOV, ZAPROMETOV et EROFÉEVA (56), la série I des épicatechines et de leurs dérivés est très active. Les composants suivants du tanin des feuilles de thé, à savoir, le l-épigallocatéchine, la l-épicatechine, le l-épicatechinegallate, et le épigallocatéchinegallate ont été expérimentés au point de vue de leur activité biologique. Ces quatre composés constituant 90 % de la masse du tanin en question, ont été obtenus à l'état cristallisé d'après le procédé de ZAPROMETOV [*op. cit.* (15)]



Pour mesurer l'activité pharmacodynamique de ces substances, on utilisait deux indices ; 1) le temps de l'apparition des pétéchies (épanchements sanguins punctiformes périvasculaires).

2) Variation du poids des animaux (Rats blancs jeunes).

On sait que les caractéristiques de l'avitaminose-P, sont les suivant : la fragilité des capillaires et l'activation de la fonction de la glande thyroïde ce qui accélère le métabolisme, d'où le freinage de la croissance et la diminution du poids. Une telle délimitation des fonctions des substances, douées de l'activité pharmacodynamique, n'a pas notée dans les travaux antérieurs.

Les mesures ont été faites en trois stades ; avant le régime avitaminique, après 25 jours du régime et après 23 jours du traitement. Le dérèglement des fonctions de la glande thyroïde a été obtenue grâce à l'emploi de la caséine iodée. Les expériences ont démontré que la 1-épigallocatechine et la 1-épigallocatechinegallate inhibent l'hypertrophie de la glande thyroïde ; les deux autres catéchines avec deux hydroxyles dans le cycle latéral sont sans activité. Les essais ont fait ressortir que quatre catéchines utilisées contribuent à l'affermissement des parois capillaires ; toutefois, les catéchines possédant des hydroxyles en position ortho sont les plus effectives ; par contre, les catéchines avec trois hydroxyles dans le cycle latéral ont peu d'activité. Le tanin amorphe se comporte en point de vue de l'activité biologique comme mélange des catéchines, tantôt augmentant la résistance capillaire tantôt inhibant l'hypertrophie des fonctions de la glande thyroïde, c'est-à-dire, l'hypéreactivité de l'hormone thyroïdienne (la thyroxine) ; ce fait est dû aux proportions variables des catéchines. Il ressort de ces recherches que les feuilles âgées, constituant un rebut du thé, peuvent être utilisées pour l'obtention des tanins à haute activité pharmacodynamique.

Les quatre catéchines mentionnées ne sont pour le moment ni identifiées ni isolées, dans le raisin. Sans la doute, l'application de la méthode chromatographique donnerait des résultats intéressants, d'autant plus que, comme nous le savons déjà, la similitude de l'œnotanin avec le tanin du thé paraît être suffisamment établie. C'est en raison de cette circonstance que l'œnochimie sera amenée à utiliser davantage les enseignements contenus dans les nombreux travaux japonais, anglais, hollandais et russes concernant le tanin du thé.

4) *L'activité vitaminique-P de différents types des vins.*

Tout récemment DOORMISCHIDZÉ, BOUKINE et EROFÉEVA (57) ont comparé l'activité vitaminique P de différents types de vins blancs et ses modifications pendant leur maturation. Ces chercheurs ont comparé, d'une part, un vin, obtenu par la fermentation du moût du raisin de cépages géorgiens RKATZITELI et MTZVANÉ et, d'autre part, deux vins d'âge différents du type géorgien (Cachétie), c'est-à-dire fermentés et ensuite macérés pendant plusieurs mois en présence des différentes parties solides du raisin et de la grappe du cépage RKATZITELI. Voici les caractéristiques chimiques de ces vins.

Vin Cépages	Année de récolte	Type du vin	Degré alcoolique	Sucre g / litre	Tanin g / litre	Indice %	
						phloro- glucinique	pyroga- lique
Rkatziteli-	1948	européen	11,2	0,12	0,28	0,7	2,5
Mtzvané	1951	géorgien	10,5	0,21	2,7	10,7	5,4
Rkatziteli	1942	»	10,7	0,15	2,25	7,8	4,7

Il est facile de constater que les vins se différencient au point de vue de leur teneur en tanin et en hydroxyles phlorogluciques et pyrogalliques.

Les essais biologiques, basés sur les mesures de la résistance capillaire, ont été faits sur les rats blancs jeunes, soumis à la diète préalable bien déterminée pendant 20 jours. Les essais proprement dits ont durés 20 jours. Les animaux recevaient soit 0,2 ml de vin, contenant 0,45-0,55 mg de tanin, soit du vin concentré préalablement dans le vide à 55° C et dilué ensuite pour contenir 1 mg de tanin dans 0,2 ml ; on a essayé également la solution alcoolique de 11° contenant de l'acide tartrique (5 ‰). Les animaux du contrôle positif recevaient 1 mg de tanin des feuilles du thé ; nous savons que ce tanin possède une activité vitaminique P très élevée.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le vin de macération de la récolte 1951 ; avec l'âge l'efficacité vitaminique diminue, ce qui a été constaté sur le vin de la récolte 1942. L'évaporation du vin dans le vide diminue également cette activité en raison de la condensation des catéchines. L'action du vin sur la résistance des capillaires se trouve en dépendance directe des teneurs en catéchines non condensées.

Types des essais	Nombre d'animaux	Temps moyen de l'apparition des pétechies en sec.	
		au début du traitement principal	à la fin du traitement principal
a) Contrôle positif (tanin).....	12	13,5	59
b) » négatif.....	10	29	20
c) Solution hydroalcoolique tartrique...	14	37	27,1
d) Vin récolte 1948 type européen réduit dans le vide à 1/3.....	14	15,3	28
c) Vin de Cachetie récolte 1951.....	11	17	116,8
» réduit à 2/3.....	12	16,5	78,0
» » à 1/6.....	14	17,1	44,2
d) Vin de Cachetie récolte 1942.....	14	36,4	55,3

Dans ces conditions nous pouvons admettre que l'activité vitaminique P des vins doit être évaluée par le dosage des polyphénolcatéchines libres solubles dans l'éther ; en effet, la d-catéchine, la l-gallocalatéchine sont solubles dans ce solvant, ainsi que dans l'acétate d'éthyle ; c'est pour cette raison que le traitement du vin par l'éther doit être effectué en premier lieu. Le rôle du premier plan appartenant aux polyphénolcatéchines, on comprend mieux les observations de BROUARDEL (58) concernant la propriété que possède le résidu du vin, après le départ de l'alcool, de guérir les malades atteints de scorbut. D'autre part, nous avons vu que le vin, issu de la fermentation sans macération, ne possède qu'une activité vitaminique P très faible ; dans ce cas. le faible pouvoir antiscorbutique du vin entier disparaît lorsque le vin est concentré, c'est-à-dire débarrassé de son alcool ; c'est dans ce sens que les observations de M^{me} RANDOIN (59) doivent être interprétées ; c'est une confirmation supplémentaire que les propriétés antiscorbutique du vin ne sont pas dûes à la présence de l'acide ascorbique.

IV. — CONCLUSION.

Il est fort bien connu que les propriétés physiologiques du vin lui confère la signification d'un aliment favorable à la bonne marche des fonctions normales digestives, nutritives et psycho-motrices. Le vin, aliment énergétique, est également un aliment plastique en raison de ses constituants indispensables à l'entretien de l'organisme. Il y a une dizaine d'années la valeur des constituants biologiques du vin trouvait tout son pouvoir maximum dans certaines substances douées de l'activité catalytiques ; une place prépondérante était réservée aux vitamines, B¹, B¹ et acide ascorbique. Notons que le vin renferme ce dernier en très faible proportions. D'autre part, les éléments tels que calcium, magnésium, sodium, potassium, phosphore, silicium ainsi que ceux qui apparaissent à l'état de traces, fer, manganèse, zinc, iode existent dans le vin à l'état de combinaisons organiques ; ils concourent aux phénomènes d'ordre catalytique et renforcent l'action des vitamines. Nous avons vu précédemment que le vin possède des propriétés pharmacodynamiques grâce à la présence de certaines catéchines ; il faut veiller sur leur conservation par l'emploi des procédés œnotechnologiques convenablement choisis. Certains vins sont plus efficaces que d'autres pour l'organisme par leurs qualités biologiques. A ce propos notons que les vins très jeunes possèdent des propriétés diététiques particulières appréciées instinctivement par la population des régions viticoles. Le rôle de l'œnologie est de rechercher les moyens d'exalter ces qualités par augmentation des quantités des acides organiques non saturés, de vitamines, de tanins, des substances minéro-organiques. Sans doute, la valeur de certains vins rouges doit s'expliquer par leur richesse en de tels constituants comme c'est le cas aussi de quelques vins doux naturels.

BIBLIOGRAPHIE

- (1 a) DOUGNAC (F.). — Le vin, 1935, Delmas éd., Bordeaux.
- (1 b) LOEBENSTEIN-LOEBEL. — Traité sur l'usage et les effets des vins dans les maladies dangereuses et sur la falsification de cette boisson, 1817, éd. franç., Strasbourg.
- (2) PROTOSSERDOV (N.). — Propriétés diététiques et médicinales du vin du raisin ; 1948, 42, Pitschépromizdat, Moscou.
- (3) HEDON et ROOS. — L'alcool aliment, *Revue gén. des sc. appl.*, 30 juin 1903.
- (4) ALQUIER (J.). — Valeur biologique et hygiénique du vin. *Rev. Vit.*, **70**, n° 1883, 361 et suite, 1929.
- (5) KLIEW (H.) et GILLISSEN (G.). — Der Deutsche Weinbau, *Wissenschaftl. Beihefte*, **5**, 169 ; 1951.
- (6) GILLISSEN (G.). — Der Deutsche Weinbau, *Wissenschaftl. Hefte*, **5**, 133, 1952.
- (7 a) FLANZY (M.) et CAUSERET (J.). — Contribution à l'étude phys. des boissons. *Ann. Tech. Agr. I. N. R. A.*, **1**, 227, 1952.
- b) FLANZY (M.), CAUSERET (J.), Melles GUERILLAT et HUGUOT. — Action comparée de l'ingestion prolongée de divers vins sur l'organisme. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **39**, 109, 1953.
- (8) Valeur alimentaire et hygiénique du vin. *Bull. Office Int. Vin.*, 10 juillet 1952.
- (9) DRACZYNSKI (M^{me}). — Jahrbuch Wein und Rebe, 25, 1950-1951.
- (10) MASQUELIER (J.) et JENSEN (H.). — Recherches sur l'action bactéricide des vins rouges. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **91**, n° 1, 24, 105, 1953.

- (11) Antibiotiques dans le vin. *Wine Institute Bulletin U. S. A.*, 19 août 1953.
- (12) GENEVOIS (L.) et RIBÉREAU-GAYON (J.). — Le vin, 124, 1947, Paris, Hermann éd.
- (13) RODOPOULO (A.). — a) Oxydation de l'acide tartrique en prés. des sels des métaux lourds. *Izvestiya Akad. Naouk (Bulletin Ac. Sci.) S. S. S. R.*, n° 3, 115, 1951. b) Processus oxydoréducteurs pendant l'élaboration des vins. *Vinédolié i Vinogradarstvo (Œnologie et viticulture) S. S. S. R.* 12, n° 1, 21, 24, 1952.
- (14) BARAUD (J.). — La réaction de la tartrazine appliquée à l'étude des vins. *Bull. Soc. chim. Fr.*, n° 5, 625, 1953.
- (15) ZAPROMETROV (M.). — Séparation chromatographique du tanin du thé. *Biochimiya, S. S. S. R.*, 17 fasc. 1, 97-107, 1952.
- (16) WILLSTATTER (R.) et ZOLLINGER (E.). — Über die Farbstoffe der Weins- traube und der Heidelbeere. *Ann.* 408, 683-109; 1915, 412, 195, 216. 1916.
- WILLSTATTER (R.) et MIEG (W.). — *Ann.* 408, 122, 1915.
- KARRER (P.) et WIDMER (R.). — *Helv. Chim. Acta*, 10, 5, 1927.
- (17) HEISE (R.). — Arbeiten aus d. Kaiserlich. Gesundheitsamte, 5, 619, 1889.
- (18) PETRI (W.). — Inaugenscheinnahme-Dissert, München, 1903.
- (19) PONTE (A.) et GUALDI (G.). — La determ. quant. des tanins pyrocaté- chiques en présence des tanins pyrogalliques. *Bull. Uff. Staz. Sper. Ind. Pelli.*, 9, n° 9, 233-334, 1931. Le tanin des vins et son dosage. *Ibidem*, 391-407.
- (20) RIBÉREAU-GAYON (J.) et MAURIÉ (M.). — Les composés phénoliques du vin. *Bull. Office Int. Vin*, mars-avril, 60-76; 1942.
- (21) NÈGRE (E.). — Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin, Thèse Sciences. Montpellier, *Bull. Off. Int. Vin*, nov.-déc. 20 et suite 1943. — Matières tannoïdes du vin. *Chim. et Ind.*, 68, n° 1 bis, 92-96, 1952.
- (22) POLITOVA-SOVZENKO (T.). — Substances tanniques du moût de raisin. *Vinodélie i Vinogradarstvo, S. S. S. R.* n° 12, 18, 1947.
- (23) DOURMISCHIDZÉ (S.). — Déterm. quant. de tanin dans le raisin et le vin rouge. *Biochimiya vinodéliya (Biochimie de la production vinicole) S. S. S. R.*, Fasc. 2, 169-176, 1948.
- (24) STIASNY (E.). — Collégium, 1, 438; 2, 1485, 1912.
- (25) FISCHER (E.) et BERGMANN (M.). — D'après Schmidt (O.), Die Methoden d. Fermentforschung 1, 31, 59, 1941 (cité d'après Koursanov, renvoi (26)).
- (26) KOURSANOV (A.) et KRUKOVA (N.). — Utilisation des réactions de Stiasny et de Fischer-Bergmann pour l'étude et la composition des tanins du thé. *Biochimiya tchaïnogo proizvodstva (Biochimie de la production du thé). S. S. S. R.*, 5, 25-31, 1946.
- (27) DOURMISCHIDZÉ (S.). — D-catéchine dans le tanin du raisin. *Doklady A. K. Naouk (C. R. Ac. Sc.) S. S. S. R.*, 73, n° 5, 987-990, 1950.
- (28) GENEVOIS (L.). — Matières colorantes et vieillissement du vin. *Revue des Ferm. et des Ind. Alim.*, 6, III, 1951.
- (29) DOURMISCHIDZÉ (S.). — L-gallo-catéchine dans les substances tanniques du raisin. *Doklady Akad. Naouk. S. S. S. R.*, 77, n° 5, 852-862, 1951.
- (30) GENEVOIS (L.). — Les acides caféique et férulique chez les végétaux. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, fasc. 3-4, 241, 1952.
- (31) ARMENTANO (L.), BENSATH (A.), BERES (T.), RUSZNYACK (S.) et SZENT- GYÖRGYI (A.). — Über den Einfluss von Substanzen der Flavongruppe auf die Permeabilität der Kapillären, Vitamin P. *Deut. Med. Wochschr.* 62, 1325, 1936.
- BENSATH (A.) et SZENT-GYÖRGYI (A.). — Vitamin P., *Nature*, 140, 426, 1937.
- RUSZNYACK (S.) et SZENT-GYÖRGYI (A.). — *Nature*, 138, 27, 1936.
- (32) HIGBY (R.). — Chemical nature of Hesperidin and its use as source of vitamin P. *J. Ann. Pharm. Assoc.*, 30, 629, 1941.

- SCARBROUGH (H.) et LANCET, **2**, 610, 1938.
- LAVOLLAY (J.). — Action de l'esculoside et de l'esculétol sur la résistance des capillaires. *C. R. Soc. Biol.* **139**, 270, 1945., (d'après MASQUELIER (J.). Recherches sur les pigments de la graine d'arachide, thèse Pharmacie Bordeaux 1948).
- (33) CHAMRAÏ (E.) et GOUDÉ (Z.). — *Journal bioch. Ukraine*, S. S. S. R., **24**, 110, 1952.
- (34) LAVOLLAY (J.) et PARROT (J.). — Sur la vitamine P. Activité de la catéchine (Pentahydroxyphénylbenzo- γ -pyranne) sur la résistance capillaire. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **215**, 496, 1942.
- LAVOLLAY (J.), PARROT (J.) et SEVESTRE (J.). — Sur la nature de la vitamine P. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **217**, 540, 1943.
- (35) NIERENSTEIN (M.). — *The Natural Organic Tannins*, 51, 56, 1934, Churchill éd. London.
- (36) APPEL et ROBINSON. — *J. Chem. Soc.*, 426, 1935.
- (37) FINKE (H.). — Uber eine zum Nachweis und zur Mengenbestimmung von Anthocyanen, Catéchingerbstoffen und verwandten Pflanzenbestandteilen geeignete Gruppen-reaction. *Z. Untersuch. Lebensmitt.*, **82**, 909 ; 1941.
- (38) LAVOLLAY (J.) et VIGNEAU (M.). — Sur une méthode d'oxydation de la catéchine en cyanidol. Application de cette réaction. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **217**, 86, 1943.
- VIGNEAU (M.). — Déterm. quant. des catéchines. *Fruits d'outre-mer*, n° 9, 276, 1946.
- (39) LAVOLLAY (J.) et SEVESTRE (J.). — Sur la nature de la vitamine P. Remarquable activité de l'esculoside sur la résistance capillaire. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **218**, 979, 1944.
- (40) JAVILLIER (M.). — L'évolution de la notion de la vitamine. Perspectives nouvelles de la chimie des êtres vivants. *Actualités Sc. Ind.*, **1**, 1949, Hermann éd., Paris.
- (41) JAVILLIER (M.). — Les substances agissant sur la résistance et la perméabilité capillaires et la notion de la vitamine P. *Schw. Chemiker Zeit.*, **29**, 197, 1946.
- (42) COTEREAU (H.), GABE (M.), GERO (E.) et PARROT (L.). — *Nature*, **161**, 557, 1948.
- (43) GABE (M.) et PARROT (L.). — *J. Physiol.*, **40**, 63, 1948.
- (44) LAVOLLAY (J.). — Autoxydation des diphénoles. Etat du problème de la structure de la vitamine P. *Actualités scientifiques*, 1943, Hermann éd., Paris.
- (45) OUTEVSKI (A.). — Ouspechi chimii (*Progrès de chimie biol.*) S. S. S. R., **1**, 423, 1950.
- GABE (M.) et PARROT (J.). — *J. physiol.*, **42**, 259, 1950.
- (46) LAVOLLAY (J.) et SEVESTRE (J.). — Le vin considéré comme un aliment riche en vitamine P. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **30**, 259, 1944.
- (47) GAUTHIER (A.). — *Bulletin Soc. Chim. Fr.*, **28**, 496, 1877 ; **30**, 567, 1879.
- Vin dans WURTZ (A) Dictionnaire de chimie pure et appliquée, Vol. 3, 692, Hachette, éd. Paris.
- (48) LAVOLLAY (J.), SEVESTRE (J.) et DUSSY (J.). — Sur la présence de catéchines dans un certain nombre d'espèces vég. alim., *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **218**, 82, 1944.
- (49) KOURSANOV (A.), BOUKINE (V.), POVOLOTZKAYA (K.) et ZAPROMETOV (M.). — *Biochimiya* S. S. S. R., **15**, fasc. 4, 338, 1950.
- (50) DOURMISCHIDZÉ (S.), et BOUKINE (V.). — Propriétés physiologiques des substances tanniques et colorantes du raisin. *Doklady Akad., Naouk*, S. S. S. R., **76**, n° 5, 703-706, 1951.
- (51) DOURMISCHIDZÉ (S.). — Thèses de la XV section de la section sciences agricoles de l'Ac. des Sc. de la Rép. de la Géorgie, **21**, 1950.

- (52) KOURSANOV (A.). — La déterm. quant. de la phloroglucine dans les plantes. *Biochimiya*, S. S. S. R., **6**, n° 2, 128-139, 1941.
- (53) KOURSANOV (A.) et ZAPROMETOV (M.). — Déterm. quant. des ortho. et des (1, 2, 3) hydroxyles dans les polyphénols et dans les tanins. *Biochimiya*, S. S. S. R., **14**, n° 5, 467-477, 1949.
- (54) GLASOUNOV (M.). — Travaux de l'Académie militaire de médecine S. S. S. R., **23** ; 272, 1940.
- DERGATCHEV (I.). — Problèmes de l'alimentation, S. S. S. R., **8**, (4), 24, 1937.
- MICHAILOVA (A.). — Vitamines en théorie et en pratique, **2**, (1), 97, 1937. (d'après TERENTIEVA (E.). — Ascorbigène-forme combiné de l'as. ascorbique. *Biochimiya*, S. S. S. R., **17**, n° 6, 642-645, 1952.)
- (55) MASQUELIER (J.) et JENSEN (M.). — Recherches sur l'action vitaminique P. du vin. *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, **91**, n° 1, 20, 1953.
- (56) KOURSANOV (S.), ZAPROMETOV (M.) et EROFÉEVA (N.). — Activité vitaminique des catéchines des feuilles du thé. *Biochimya*, **17**, n° 6, 729-733, 1952.
- (57) DOORMISCHIDZÉ (S.), BOUKINE (V.) et EROFÉEVA (N.). — Essais biologiques de différents types de vins. *Doklady Akad. Nauk*, S. S. S. R., **88**, n° 1, 109 ; 1953.
- (58) BROUARDEL . — Alcoolisme. *Bull. Ac. Médecine*, **2**, 10, 1886, (d'après DOUGNAC (F.). — Le vin, 290, 1935, Delmas éd., Bordeaux.)
- (59) RANDOIN (M^{me} L.). — 2^e Congrès des médecins amis des vins de France. (d'après ANDRIEU. — Les propriétés physiques et biologiques du vin. Conférence d'œnologie donnée à la faculté de Médecine de Toulouse, 23, 1939.)

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVERÈRE.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES FACTEURS DE L'ACIDITÉ DES VINS

PAR

Y. CHARPENTÉ

Ingénieur-Docteur

PLAN DU MÉMOIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES

CHAPITRE II

ÉTUDE DE LA SURMATURATION DU RAISIN PAR BOTRYTIS CINEREA

- I. — Historique des connaissances sur la pourriture noble.
- II. — Transformations produites par Botrytis cinerea cultivé sur moût de raisin.
- III. — Etude de la surmaturation du raisin par la pourriture noble.
- IV. — Composition des grands vins liquoreux.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES FERMENTATIONS DES ACIDES MALIQUE ET CITRIQUE PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES

- I. — Étude théorique.
- II. — Étude des conditions techniques de la fermentation malolactique.

Résumé et Conclusion.

Bibliographie.

INTRODUCTION

Il est reconnu que le goût d'un vin peut être considéré schématiquement comme le résultat d'un équilibre entre, d'un côté, des sensations douces et sucrées, et d'un autre côté, des sensations acides et amères. Les premières sont dues à l'alcool, au glycérol et naturellement aux sucres qui peuvent exister dans les vins ; les secondes sont dues aux acides et aux polyphénols.

Un équilibre harmonieux entre ces saveurs élémentaires, joint aux éléments particuliers du bouquet, conditionne la qualité d'un vin. Pour qu'un vin soit reconnu de qualité, il ne suffit donc pas qu'il contienne tel ou tel constituant à telle ou telle dose. Il faut en particulier que les goûts acides et astringents soient exactement équilibrés, neutralisés, pourrait-on dire, par l'impression sucrée que donnent d'autres éléments.

Les acides organiques sont certainement les substances qui influent le plus sur le goût du vin, beaucoup plus, semble-t-il que les autres constituants. Une insuffisance d'acidité rend la conservation difficile, mais un excès d'acidité est toujours préjudiciable à la qualité. L'expérience gustative montre que les grands vins bien réussis sont toujours des vins d'acidité faible. Ceci est vrai aussi bien du reste, pour les vins blancs que pour les vins rouges, pour lesquels ces principes sont bien connus. Les travaux de GENEVOIS, RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD ont mis en lumière ce rôle important des acides.

Les acides du vin ont déjà donné lieu à un grand nombre d'études analytiques. La plupart de ces travaux sont des études statiques. Elles considèrent la composition, les caractères d'un vin, ses particularités à un moment donné de son évolution. L'application expérimentale à l'oenologie des connaissances sur le métabolisme des acides organiques est encore incomplète. Les observations anciennes sont souvent peu utilisables parce que leurs auteurs manquaient de moyens d'investigation précis et sûrs, et principalement de méthodes analytiques. La seule étude d'ensemble suffisamment détaillée est celle de PEYNAUD (I), qui, après avoir donné des techniques de dosage, suivit l'évolution des acides au cours de la maturation du raisin, de la fermentation alcoolique et de la fermentation malolactique. Mais l'auteur lui-même n'envisageait son travail que comme une introduction à l'étude de ces problèmes.

D'après ces travaux, les phénomènes d'ordre biochimique qui commandent la composition acidimétrique d'un vin, sont dans l'ordre chronologique : la maturation du raisin, la fermentation alcoolique, la fermentation malolactique et les fermentations lactiques de maladie.

La maturation du raisin s'effectue sous l'influence de divers facteurs,

variables chaque année, et qui chaque année en modifient l'évolution. Ce sont entre autres : les conditions climatiques, le sol, le cépage, l'exposition du vignoble, facteurs qui commandent l'équilibre entre la migration et la combustion respiratoire, dont dépend le stockage des réserves dans le fruit. L'étude de la maturation des raisins a déjà fait l'objet de nombreuses publications qui ont développé et confirmé les travaux anciens de GIRARD et LINDET (2). PEYNAUD a entrepris au cours de deux années consécutives une étude systématique de la maturation dans laquelle il a montré, notamment, le rôle des facteurs énoncés précédemment et la présence dans les moûts étudiés des seuls acides malique, citrique et tartrique ; du moins les autres acides organiques présents n'ont pas une concentration supérieure au milliéquivalent par litre. Cet auteur a mis en évidence l'importance pour la qualité du vin, du taux d'acide malique du raisin.

La formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique, en particulier des acides, a été étudiée d'une manière très approfondie, depuis PASTEUR, par de nombreux chercheurs. Les hypothèses de GÉNEVOIS à ce sujet (3) ont été confirmées par un très grand nombre de documents analytiques (4).

Les transformations du vin par les bactéries ont donné lieu à d'importantes études, tant en ce qui concerne la fermentation malolactique que les fermentations de maladie. L'importance de la fermentation malolactique a été bien établie en France par les travaux de FERRÉ (5) et de RIBÉREAU-GAYON (6).

La contribution à l'étude des acides que nous apportons dans notre travail, se limite à deux phénomènes qui jouent pour la vinification des vins blancs le même rôle essentiel, puisqu'ils aboutissent finalement à une diminution de l'acidité du vin. Ce sont l'action du *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture noble, sur les acides des raisins et l'action des bactéries malolactiques sur les acides des vins.

La plus grande partie des vins blancs récoltés en Gironde provient de raisins plus ou moins pourris. L'usage de ne commencer les vendanges que lorsque les raisins sont suffisamment attaqués par le *Botrytis cinerea* s'est de plus en plus généralisé. Or, si l'on connaît assez bien l'évolution de la composition d'un raisin sain au cours de sa maturation, encore qu'on ne puisse pas la prévoir en fonction des conditions atmosphériques de l'année, on connaît beaucoup plus mal l'influence du *Botrytis cinerea* sur les différents constituants du raisin.

Les études sur ce sujet sont anciennes, et cependant on ne peut nier l'intérêt d'une connaissance plus précise des phénomènes qui sont le fondement de la composition des grands vins blancs. C'est dans ce but qu'il nous a paru utile d'entreprendre l'étude de ces phénomènes, en ayant principalement en vue les transformations acidimétriques qu'ils pro-

voquent. Le chapitre II de notre travail groupe les essais sur la physiologie du *Botrytis cinerea*, effectués au laboratoire et au vignoble.

Nous consacrons le chapitre III à l'étude de la fermentation malolactique appliquée plus spécialement aux vins blancs. Nos connaissances à ce sujet concernaient surtout les vins rouges. Nous exposons les résultats de notre expérimentation s'appliquant à l'étude des mécanismes ou visant à atteindre un but pratique. Nous essayons de préciser les relations de cette transformation avec différents facteurs et notamment avec les conditions de la vinification. Nous recherchons d'autre part à nous rendre compte de son utilité pratique dans le cas des vins blancs secs.

Pour mener à bien ces études, il a été nécessaire de mettre au point des méthodes de dosage appropriées. La grande richesse en sucre des moûts de raisin et des vins liquoreux rend souvent difficiles certaines déterminations. C'est ainsi que les dosages de l'acide lactique et du glycérol ont dû subir des adaptations qui d'ailleurs rendent ces méthodes plus correctement applicables à tous les milieux. De même nous avons dû instituer une méthode de dosage de l'acide gluconique, pouvant s'appliquer également à des milieux très sucrés. Ces études analytiques sont rassemblées dans le premier chapitre.

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES

Nous donnerons un exposé rapide des bilans acidimétriques, ainsi que du principe des différentes méthodes d'analyses qui ont permis la préparation de ce travail. Nous insistons particulièrement sur trois méthodes de dosage auxquelles nous avons apporté une contribution personnelle importante : dosages des acides lactique et gluconique et dosage du glycérol.

Dans l'analyse détaillée des acides d'un milieu, l'établissement du bilan acidimétrique fournit la preuve que tout a été correctement dosé. Dans le cas où le bilan n'est pas équilibré, il renseigne sur la proportion d'acides indosés. Comme l'indiquent RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (7) on peut dresser différentes sortes de bilans des acides.

Bilan acidimétrique. — Les milieux que nous étudierons, moûts de raisins et vins, ont une acidité correspondant comme ordre de grandeur à celle d'une solution décimormale ; leur pH est compris entre pH 3,0 et 4,0. Ces milieux sont constitués, au point de vue acidimétrique, par des acides organiques, partiellement neutralisés par des bases ; une partie de ces

acides est à l'état de sels, l'autre est à l'état libre. La fraction libre est déterminée en neutralisant le vin avec de la soude titrée jusqu'à la neutralité théorique (pH 7,07) ; elle correspond à l'acidité de titration. La fraction salifiée est représentée en première approximation par l'alcalinité des cendres, majorée de la petite quantité de cation ammonium présente. On trouvera les détails concernant ces déterminations dans les traités classiques (8). En définitive la somme des anions dosés individuellement doit être égale à la somme : acidité de titration + alcalinité des cendres.

Bilan d'une transformation. — Au cours d'un phénomène qui affecte la composition acidimétrique du vin, on peut établir le bilan de la transformation des acides. Si les analyses sont exactes et si l'on a vraiment dosé toutes les substances à fonction acide apparues ou disparues, la somme des variations des cations doit égaler la somme des variations des anions déterminés individuellement.

Dosage des cations. — L'acidité de titration a été titrée en utilisant la phénolsulfonephtaléine comme indicateur externe, selon la méthode de GILLE (9). On titre ainsi jusqu'à pH 7,4. L'alcalinité des cendres a été déterminée selon les prescriptions de JAULMES (10). Le cation ammonium a été dosé après déplacement par la magnésie suivant le mode opératoire décrit par PEYNAUD (11).

Dosage des anions. — L'acide phosphorique a été dosé par la méthode céruléo-molybdique de DENIGÈS (12), l'acide tartrique par la méthode KLING, modifiée par PEYNAUD (13), l'acide citrique par la méthode KOGAN, modifiée par PEYNAUD (14), l'acide malique par la méthode PEYNAUD par transformation en éthanal par oxydation manganique ménagée à pH 3,5 (15).

Pour ces deux dernières méthodes nous avons utilisé le nouveau mode opératoire de l'auteur, qui fait appel à la centrifugation pour la séparation du précipité des sels barytiques, à la place de la filtration. La centrifugation permet une séparation et un lavage des précipités plus rapides. De même, par simplification, on opère l'oxydation manganique des acides sur la totalité de la prise d'essai qui a servi à la précipitation. Il n'y a pas lieu de séparer le sulfate de baryum qui se forme lorsqu'on déplace les acides par l'acide sulfurique. Pour l'acide malique on pratique la précipitation sur 1 ou 2 cm³ de moût ou de vin ; pour l'acide citrique on opère sur 25 cm³. L'oxydation manganique est opérée avec le modèle d'appareil distillatoire déjà décrit (16) ou avec une variante de ce modèle dont on trouvera plus loin le croquis (fig. 1)

Méthode de dosage de l'acide lactique

La mise au point de cette méthode ayant fait l'objet d'une publication en 1950, nous en donnons simplement ici le principe et la description du mode opératoire auquel nous nous sommes arrêté.

La méthode repose sur l'oxydation quantitative de l'acide lactique en éthanal par oxydation manganique opérée à l'ébullition dans un appareil à distillation comportant un tube abducteur permettant l'écoulement goutte à goutte du permanganate très dilué. On titre l'éthanal formé par la méthode au sulfite, selon Jaulmes et Espezel. Une défécation préalable du vin écarte les autres acides organiques par précipitation plombique et les sucres par précipitation barytique dans l'alcool. Le 2,3 butanediol dont l'oxydation donne de même de l'éthanal, est chassé par évaporation à sec, l'acide lactique étant retenu à l'état de sel.

Mode opératoire. — 20 cm³ de vin, dont la teneur en sucres ne doit pas dépasser 35 à 50 g par litre, placés dans un tube de centrifugeuse sont déféqués par 5 cm³ d'acétate basique de plomb ($d = 1,23$). Si la

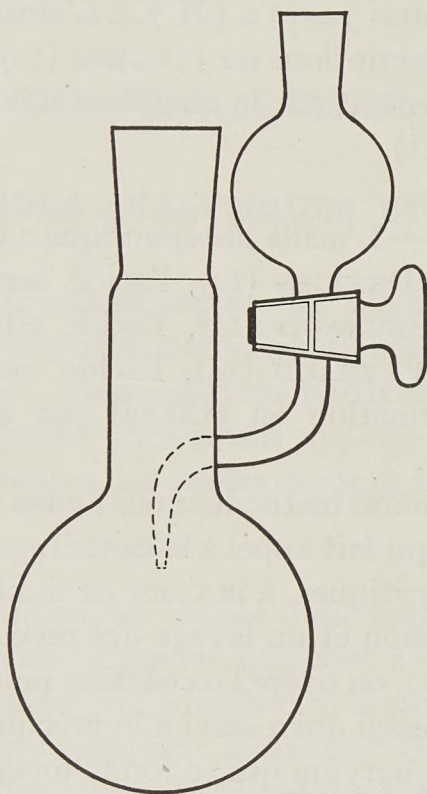


FIG. 1. — Appareil pour oxydation manganique.

richesse en sucres est plus grande, on opère une dilution préalable. On centrifuge. On prélève 5 cm³ du liquide clair (correspondant à 4 cm³ de vin) et on les place dans une fiole jaugée de 50 cm³ contenant 4 g de baryte pure hydratée finement pulvérisée. On ajoute peu à peu de l'alcool absolu

en agitant constamment pour éviter la prise en masse du précipité. On complète au trait de jauge avec de l'alcool, on attend 2 heures et on filtre ; un contact de 15 minutes, comme il avait été déjà indiqué, peut n'être pas suffisant dans le cas de vins très sucrés.

Pour doser l'acide lactique, on prélève 25 cm³ du filtrat alcoolique correspondant à 2 cm³ de vin. On fait passer, à l'aide d'un tube effilé un courant de gaz carbonique jusqu'à ce que le léger précipité formé se dissolve.

On chasse alors le 2,3 butanediol et l'alcool en évaporant à sec au bain-marie le liquide placé dans un bécher à fond plat. Dans les conditions indiquées, il n'y a pas de perte d'acide lactique qui est entièrement salifié ; après l'évaporation on se trouve à pH 6,4. On reprend la croûte blanche formée par 5 cm³ d'acide sulfurique N et on porte quantitativement liquide et précipité dans l'appareil d'oxydation.

On porte le liquide à l'ébullition et on laisse tomber le permanganate N/200 à raison d'une goutte toutes les deux secondes. On recueille le distillat dans un tampon de sulfite à pH 7. On poursuit la distillation nettement après que le liquide a pris une coloration brune indiquant la présence d'oxydes de manganèse. Puis on titre l'éthanal recueilli selon la méthode JAULMES et ESPEZEL en employant l'iode N/100.

1 cm³ d'iode N/100 correspond à 5 micromolécules, soit 0,45 mg d'acide lactique.

Méthode de dosage colorimétrique du glycérol

Nous avons étudié ailleurs en détail la mise au point de cette méthode de dosage que nous utilisons depuis 1950 (17). Notre but était l'établissement d'une technique permettant le dosage du glycérol dans les vins très liquoreux, ayant jusqu'à 100 g de sucres réducteurs par litre, et dans les moûts de raisin, en particulier dans les moûts provenant de raisins « pourris nobles », attaqués par le *Botrytis cinerea*. Nous en donnons ici le principe et le mode opératoire, tel que nous l'appliquons depuis plusieurs années.

La méthode est basée sur l'oxydation du glycérol en formol par l'acide periodique ; on effectue un dosage colorimétrique du formol apparu, à l'aide de l'acide chromotropique, réactif spécifique du formol. Une méthode fondée sur le même principe a été depuis publiée par OURNAC (18).

La première partie du dosage consiste en une défécation conduite exactement selon les modalités décrites pour le dosage de l'acide lactique, et dont le but est d'écarter les substances génératrices de formol par oxydation periodique. Ces deux dosages débutent de la même façon. Il y a lieu simplement de ramener par dilution, avant défécation, la teneur en sucres aux environs de 40 g par litre.

Du reste, à cause de la grande sensibilité de la méthode l'oxydation finale ne doit porter que sur des quantités de glycérol voisines de 0,5 micro-molécule dans la prise d'essai et une dilution de tous les vins, même secs, est nécessaire. On dilue habituellement 10 fois, puis on procède comme il a été indiqué pour l'acide lactique, à la double défécation plombique et barytique.

Une prise de 1 cm³ du filtrat obtenu, mesurée avec une pipette de précision, et correspondant à 0,08 cm³ de vin dilué, est portée dans un tube à essai bouchant à l'émeri, jaugé à 25 cm³.

On oxyde par 1 cm³ d'acide periodique N/50. On laisse poursuivre l'oxydation 15 minutes à la température du laboratoire, pas davantage, l'excès d'acide periodique et les iodates formés sont réduits par une solution sulfureuse contenant 1 g par litre d'acide sulfureux, introduite goutte à goutte. De l'iode est d'abord libéré et colore le liquide en jaune ; on poursuit les affusions de solution sulfureuse jusqu'à la goutte qui décolore définitivement le liquide.

On ajoute alors 5 cm³ de réactif chromotropique préparé de la façon suivante : à 5 cm³ d'une solution aqueuse d'acide chromotropique à 50 g par litre, on ajoute 100 cm³ d'acide sulfurique très pur. Rappelons que la solution aqueuse chromotropique se conserve une dizaine de jours à la glacière à l'abri de la lumière ; elle ne doit d'ailleurs être utilisée que 24 heures après sa préparation. Le réactif chromotropique sulfurique doit être utilisé aussitôt après sa préparation.

Après l'addition du réactif, on chauffe le tube 30 minutes au bain-marie bouillant. Il se développe une coloration violette dont l'intensité est en rapport avec la teneur en formol. Après ce temps de chauffage, on refroidit, on complète à 25 cm³ avec de l'eau distillée, on mélange et on colorimètre avec un appareil sensible en lumière monochromatique verte (5400 angstroms). Nous avons utilisé pour ces mesures soit l'électrophotomètre de MEUNIER, soit l'absorptiomètre de DOGNON.

On a soin d'opérer chaque fois un essai à blanc avec tous les réactifs, en opérant sur 5 cm³ d'eau déféquée et oxydée de la même façon. On obtient toujours ainsi une légère coloration sur laquelle on règle le zéro de l'électrophotomètre. On trace la droite d'étalonnage une fois pour toutes, avec l'appareil utilisé, à partir de taux exactement connus de glycérol. La quantité de glycérol en micromolécules dans la prise d'essai multipliée par 125 donne le taux de glycérol en millimolécules par litre de vin lorsque le rapport de dilution est de 10.

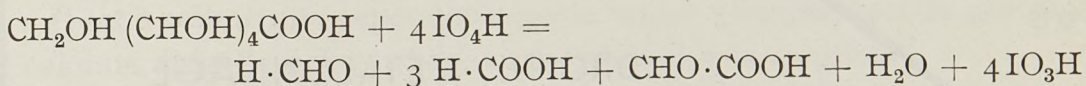
Méthode de dosage de l'acide gluconique

La méthode que nous indiquons est également basée sur la production de formol par oxydation periodique de l'acide gluconique.

Dans les moûts ou les vins on écarte les pectines, les gommes et les polyphénols par une défécation préalable. On précipite l'acide gluconique, avec les autres acides, sous forme de sel de calcium dans l'alcool à 72° en milieu neutre. Il est à remarquer qu'aucun des acides organiques du vin qui sont oxydables par l'acide periodique, ne donne de formol. De façon à éliminer toute trace de sucre qui serait une cause importante d'erreur, on procède à une seconde précipitation de purification après dissolution du premier précipité. Le second précipité ainsi obtenu subit l'oxydation periodique et on termine par un dosage colorimétrique du formol apparu.

Il nous a été donné de faire connaître d'une manière très condensée, le mode opératoire de cette méthode (19). Nous reprendrons ici la discussion des opérations successives et donnerons les essais ayant servi à établir le mode opératoire définitif.

Oxydation periodique de l'acide gluconique. — L'action de l'acide periodique sur cet acide a été étudiée par FLEURY et LANGE (20), qui en ont donné la formule suivante :



Une molécule d'acide gluconique donne une molécule de formol et une molécule d'acide glyoxylique, mais les auteurs n'avaient pas obtenu le rendement quantitatif en aldéhydes même après 6 heures de contact. Dans nos essais, conduits à partir du gluconate de calcium, nous avons obtenu en 15 minutes, par oxydation en milieu acide, des rendements en aldéhydes de 98 p. 100. Les fonctions aldéhydes peuvent être titrées par combinaison sulfite et iodométrie. On obtient deux fonctions aldéhydes par molécule d'acide gluconique.

Par ailleurs, il est possible de déterminer spécifiquement le formol, à l'aide de la réaction chromotropique. On peut, à partir de quantités connues d'acide gluconique, établir une droite d'étalonnage permettant son dosage colorimétrique.

Tracé de la droite d'étalonnage. — On prépare une solution contenant exactement 1 méq d'acide gluconique par litre, en dissolvant 215 mg de gluconate de calcium dans un litre d'eau distillée. Dans des tubes à essais jaugés à 25 cm³ et munis de bouchons rodés, on introduit 0,1-0,25-0,50-0,75-1,00-1,25 et 1,50 cm³ de solution, correspondant aux mêmes valeurs en microéquivalents. On ajoute 1 cm³ d'acide periodique N/50, on agite et laisse en repos 15 minutes. On détruit alors l'excès d'acide periodique par une solution sulfureuse à 1 g par litre, ajoutée goutte à goutte jusqu'à

disparition de la coloration jaune, provenant de l'iode libéré. On ajoute 5 cm³ du réactif chromotropique, préparé comme il a été déjà indiqué pour le glycérol, et on porte 30 minutes au bain-marie bouillant. On refroidit, on complète à 25 cm³ avec de l'eau distillée et on mesure l'intensité de la couleur apparue à l'électrophotomètre de MEUNIER ou à l'absorptiomètre de DOGNON.

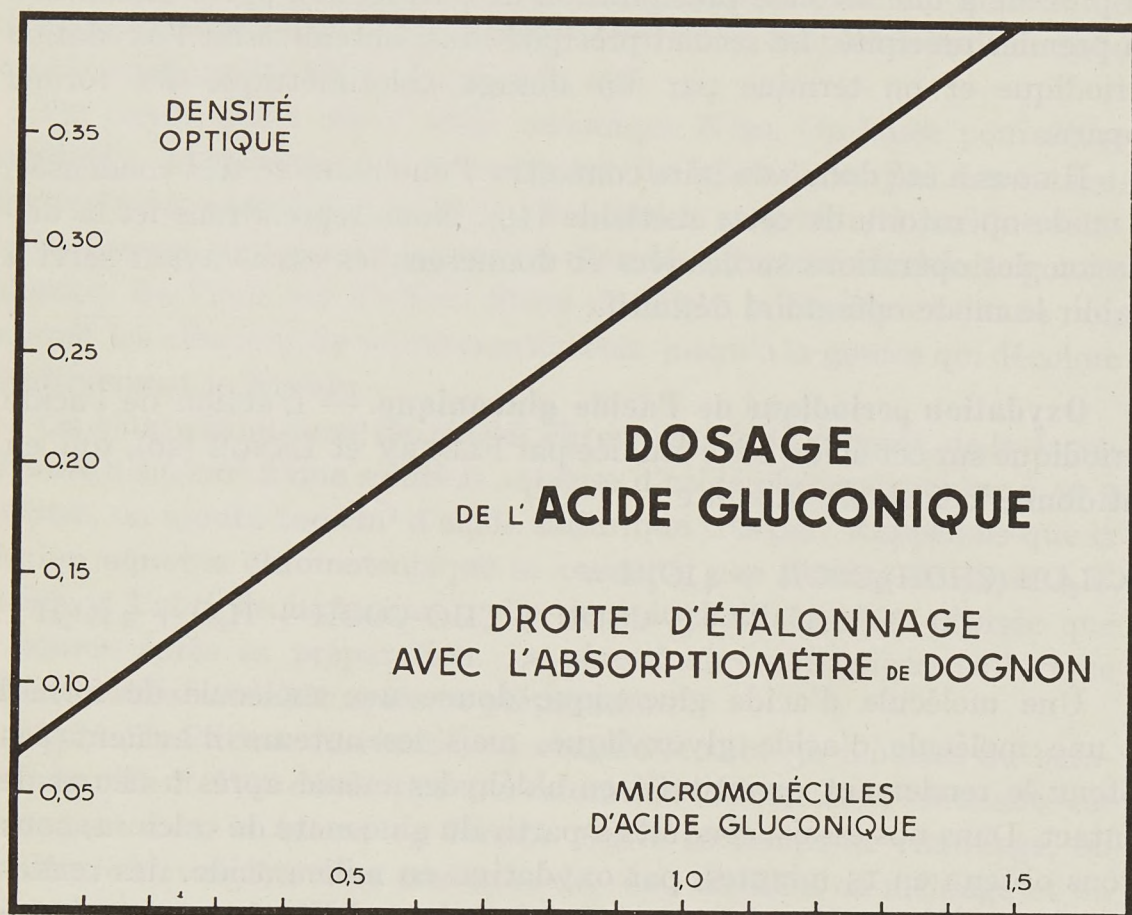


FIG. 2. — Droite d'étalonnage de l'acide gluconique.

On construit ainsi la droite d'étalonnage que reproduit le graphique n° 2.

Séparation de l'acide gluconique à l'état de sel de calcium. — Dans le vin ou le moût, milieux complexes, l'acide gluconique doit être d'abord séparé des autres substances oxydables par l'acide periodique avec production de formol, en particulier des sucres. A cet effet on utilise la propriété du sel de calcium d'être insoluble dans l'alcool. Le gluconate de baryum est plus soluble que le gluconate de calcium, ainsi que le montrent les essais suivants. On a précipité en milieu neutre, à différentes concentrations en alcool, 10 cm³ d'une solution environ N/100 d'acide gluconique, par un excès d'ions baryum ou calcium. Le tableau I donne les proportions d'acide gluconique précipité.

TABLEAU I

Précipitation des gluconates de baryum et de calcium

On opère la précipitation sur 0,95 méq d'acide.

Titres alcooliques	Gluconate de baryum		Gluconate de calcium	
	Quantité précipitée	Rendement %	Quantité précipitée	Rendement %
20°	0,40	42	0,46	48
30°	0,55	58	0,58	61
40°	0,67	70	0,79	83
50°	0,80	84	0,94	99
60°	0,90	95	0,94	99
80°	0,94	99	0,94	99

On voit dans ce tableau que la totalité de l'acide gluconique est précipitée par le calcium dès 50° d'alcool, tandis qu'il faut un titre alcoolique de 80° pour obtenir le même résultat avec le baryum comme agent précipitant.

Il est à remarquer cependant que la bonne précipitation du gluconate de calcium exige la présence d'ions sodium dans la solution.

Conduite de la précipitation. — Les principaux constituants des moûts et des vins susceptibles de donner du formol par oxydation périodique, et de fausser ainsi le dosage, sont les sucres, le glycérol, les gommes, les arabanes, les pectines, certains groupements protéiques, les flavones, les sucres, etc. Le glycérol n'est pas entraîné par précipitation, mais les gommes, les matières pectiques, sont précipitables par l'alcool, et doivent être au préalable éliminées. Ces substances conduiraient à la formation de formol en proportion telle que, comme nous avons pu le constater, leur présence fausserait le dosage de 20 à 30 p. 100. On les précipite dans l'alcool à 80° en milieu acidifié.

La séparation de l'acide gluconique d'avec les sucres pose certains problèmes. En effet, la précipitation à la neutralité par un excès d'ions calcium, entraîne toujours une petite quantité de sucres. L'erreur est importante, bien que le glucose et le lévulose soient oxydés beaucoup plus lentement que l'acide gluconique. En milieu alcalin, l'insolubilisation du sucre est encore plus forte, et il faut opérer exactement à la neutralité.

La quantité de sucre entraînée étant proportionnelle à la quantité de sucre initiale du milieu, on tourne cette difficulté en redissolvant le premier précipité et en renouvelant la précipitation de l'acide gluconique. Dans ces conditions les quantités de sucre entraînées sont négligeables, comme le montre le tableau II.

TABLEAU II

Double précipitation du gluconate de calcium

Les chiffres sont des milliéquivalents

		Doses théoriques	Précipitation simple		Double précipitation	
			trouvé	erreur	trouvé	erreur
Milieu synthétique	1	10,0	10,2	0,2	9,6	— 0,4
	2	10,0	14,0	+ 4,0	9,5	— 0,5
Milieu synthétique	1	0	7,7	+ 7,7	0,2	+ 0,2
	2	0	4,3	+ 4,3	0,1	+ 0,1
Moût de raisin		0	5,7	+ 5,7	0,4	+ 0,4

Nous avons opéré sur des milieux synthétiques contenant 250 g de sucres par litre, et présentant la composition acidimétrique des moûts, ayant ou n'ayant pas reçu d'acide gluconique, et sur un moût provenant de raisins sains et probablement exempt d'acide gluconique.

Par deux précipitations successives on arrive donc à séparer d'une manière satisfaisante de petites quantités d'acide gluconique en face de très fortes concentrations en sucres.

Mode opératoire de la précipitation. — 5 cm³ de moût de raisin ou de vin, préalablement débarrassé des substances flavoniques et anthocyanes par traitement avec une minime quantité de charbon activé, sont placés dans un tube de centrifugeuse. On ajoute 2 gouttes d'acide chlorhydrique pur, puis 20 cm³ d'alcool absolu. On mélange et on laisse en glacière 24 heures. Après ce temps on centrifuge, on lave le précipité à l'alcool et on recueille tous les liquides dans un autre tube de centrifugeuse où on effectue la précipitation. Pour ce faire, on ajoute 1 cm³ de chlorure de calcium à 20 %, puis goutte à goutte une solution alcaline — 100 cm³ d'ammoniaque à 22°B, 40 g de soude par litre — jusqu'au virage de la phénolsulfonephtaléine. On mélange et on laisse 4 heures à la glacière. Le précipité obtenu est séparé par centrifugation, lavé à deux reprises avec 10 cm³ d'alcool à 72°. On l'égoutte, on le reprend par 5 cm³ de solution chaude d'acide chlorhydrique environ N/2. La dissolution est rapide.

On renouvelle alors la précipitation en ajoutant 1 cm³ de la solution de chlorure de calcium et de la solution alcaline jusqu'au virage de la phénolphtaléine. On introduit 25 cm³ d'alcool à 96°. La coloration rose disparaît, mais le pH doit rester aux environs de 8 (en tout cas le bromothymol bleu doit rester bleu dans un essai à la touche). On mélange, on

laisse de nouveau en repos 4 heures à la glacière. Ce nouveau précipité, séparé par centrifugation, est lavé par 10 cm³ d'alcool à 72°. Il est bien égoutté et entraîné par un jet de pissette d'eau distillée, à l'aide d'un entonnoir, dans un flacon jaugé de 50 cm³.

TABLEAU III

Exactitude de la méthode de dosage de l'acide gluconique

Les chiffres d'acide gluconique sont des milliéquivalents

	Sucres réducteurs g	Acide gluconique ajouté	Chiffre trouvé	Chiffre théorique	Différence
Milieu synthétique	250	10,0	9,4	10,0	— 0,6
Moût n° 1	165	0 10,0	1,2 10,8	11,2	— 0,4
Moût n° 2	220	0 5,0 10,0	0,7 5,6 10,0	5,7 10,7	— 0,1 — 0,7
Moût n° 3	177	0 10,0	9,7 18,4	19,7	— 1,3
Moût n° 4	288	0 5,0 10,0	3,2 8,2 12,1	8,2 13,2	— 0,1 — 0,9

Avant de compléter au trait de jauge, on acidifie par 5 cm³ d'acide sulfurique au tiers et on mélange. C'est sur ce liquide qu'on effectue l'oxydation periodique selon les modalités déjà décrites. Suivant la teneur en acide gluconique, on opère sur 1 ou 2 cm³ de ce liquide, contenant l'acide gluconique de 0,1 ou 0,2 cm³ de moût ou de vin.

Nous avons vérifié l'exactitude de cette méthode en opérant sur des milieux synthétiques de richesse connue en acide gluconique et sur des vins et des moûts additionnés de quantités connues du même acide. Comme le montre le tableau III, on retrouve assez bien les chiffres théoriques. Les erreurs les plus fortes, généralement par défaut, sont de l'ordre du milliéquivalent par litre, l'erreur moyenne du demi-milliéquivalent.

CHAPITRE II

**ÉTUDE DE LA SURMATURATION DU RAISIN
PAR BOTRYTIS CINEREA (Pourriture noble)**

Dans ce chapitre nous étudions les transformations dont la baie de raisin est le siège sous l'influence de la « pourriture noble ». Cette forme particulière de surmaturation est la conséquence de l'envahissement de la baie de raisin par un champignon microscopique : le *Botrytis cinerea*. Des cultures de *Botrytis cinerea* au laboratoire ont permis d'étudier la physiologie de ce champignon. Nous déterminons la combustion du sucre et des acides qu'il provoque, et les conséquences de ces transformations sur la composition acidimétrique du jus de raisin sont mises en valeur. Les formations de glycérol et d'acide citrique sont étudiées. D'autre part on montre que le *Botrytis cinerea* forme dans les raisins de l'acide glucannique. La composition très particulière des grands vins blancs liquoreux est finalement le reflet de l'action de *Botrytis cinerea* sur le raisin.

On peut envisager plusieurs définitions de la surmaturation du raisin. La première correspond à cette période qui suit la maturation proprement dite et dans laquelle, les échanges étant coupés avec la plante, le raisin est soumis à un phénomène de consommation. La surmaturation peut être encore provoquée sous l'action de la chaleur solaire ou artificielle. Elle fait alors l'objet de vinifications spéciales (vin jaune, vin passerillé, etc) ou d'enrichissement du moût (1). Mais c'est la surmaturation du raisin obtenue grâce à la pourriture noble qui nous intéresse plus particulièrement ici.

La « pourriture » du raisin est le résultat du développement de champignons microscopiques sur la baie. Elle est dite « noble » lorsqu'elle entraîne une amélioration de la qualité de la récolte ; elle est dite « vulgaire » dans le cas contraire.

Le champignon responsable de la pourriture noble est le *Botrytis cinerea*, la photo ci-contre montre une grappe de raisin présentant tous les degrés de développement de la pourriture. Lorsque *Botrytis cinerea* attaque un grain, il commence par former une ou plusieurs taches circulaires sur la pellicule ; ces taches se développent jusqu'à recouvrir entièrement la surface du grain. La pellicule est modifiée, elle devient fragile, de couleur brune et se ternit. Comme l'indique LABORDE (2), qui a étudié la pourriture noble en Gironde, on appelle les grains rendus à ce stade, grains « pourris pleins ». (On peut voir de tels grains à droite en haut de la photo.) Lorsque l'action de la moisissure est prolongée, le grain apparaît ridé, comme ratatiné. Si la pourriture s'est développée par temps humide, les grains

portent des houppes grisâtres plus ou moins abondantes. Par contre si les conditions de température et d'humidité sont défavorables au développement aérien du champignon, le grain peut se flétrir et se dessécher

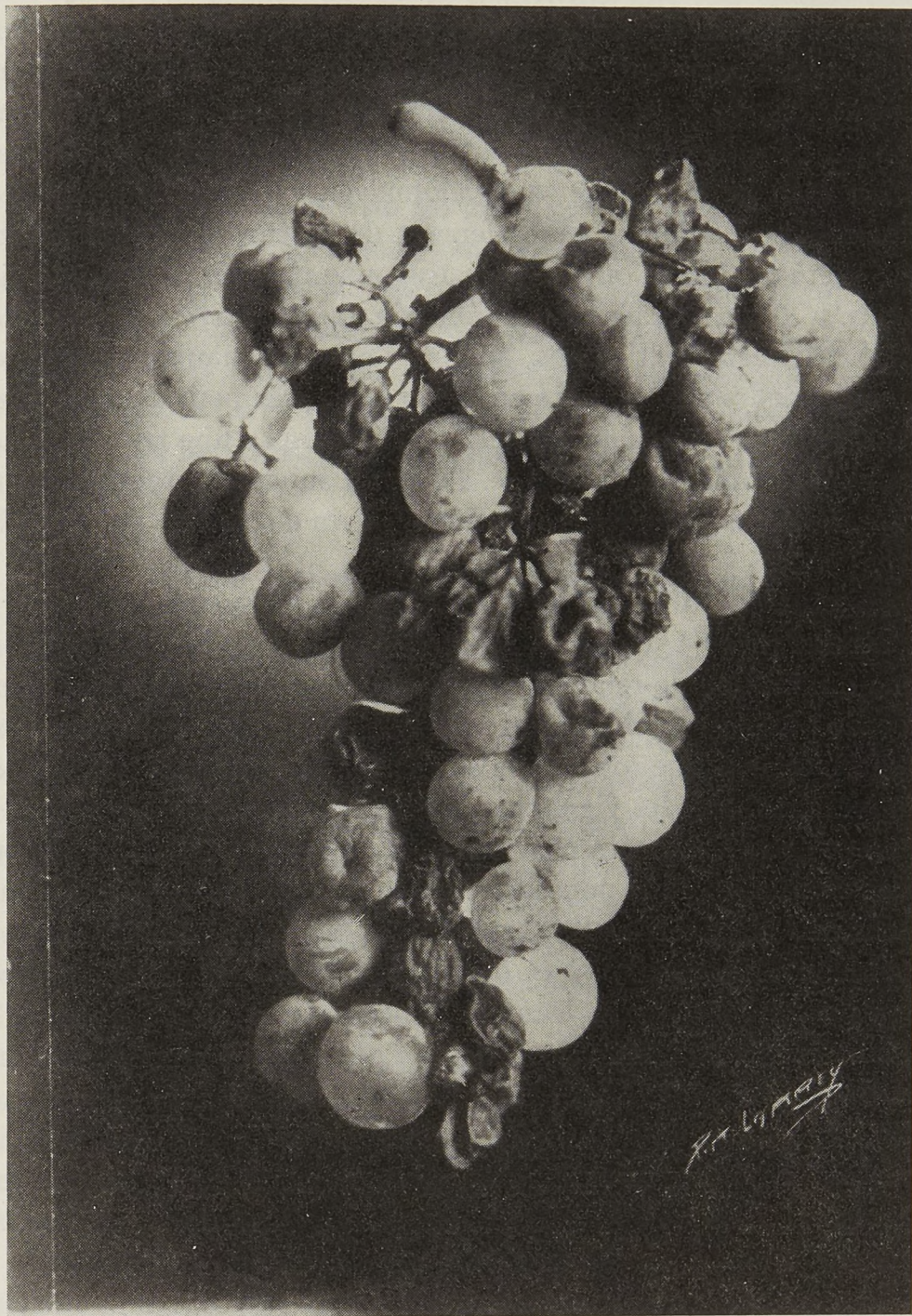


FIG. 3. — Grappe de raisin atteinte de pourriture noble.

sans qu'apparaissent ces houppes. On désigne ces grains sous le terme de grains « rôtis ».

La propagation de *Botrytis cinerea* se fait soit par contamination par les spores, soit par le contact d'un grain pourri avec un grain sain. L'envahissement d'un vignoble est habituellement lent, il est fonction des

conditions d'humidité et de température, mais il est rare qu'il soit complet d'un même coup. C'est l'alternance de périodes humides et de périodes ensoleillées qui favorise le développement de la pourriture noble. La formation de grains « rôtis » s'étale généralement sur plusieurs jours, voire quelques semaines. En conséquence les vendanges se font en plusieurs fois. On cueille par « tries » successives, en ne ramassant que les grappes ou les fractions de grappes ayant atteint un degré suffisant de pourriture. En 1950, l'envahissement a été rapide et on n'a souvent opéré que deux tries. En 1951 la pourriture se développa plus lentement ; elle intervint sur des raisins manquant généralement de maturation et le nombre de « tries » a été de quatre ou cinq. En 1953 une première « trie » du tiers de la récolte a donné, grâce à une période de temps exceptionnelle, des moûts particulièrement riches. Mais à cause du mauvais temps de fin octobre, plusieurs tries ont été ensuite nécessaires pour ramasser le complément de la récolte. Généralement on élimine par une trie de nettoyage les grains de moins bonne qualité. Les tries suivantes donnent les « vins de tête ». La dernière cueillette fournit un « vin de queue » de moins bonne qualité.

La réduction du volume de la récolte sous l'influence de la pourriture noble atteint jusqu'à 50 p. 100. L'obtention de la qualité est conditionnée par une diminution de rendement et on conçoit que les vins obtenus par ce procédé puissent atteindre des prix très élevés, et que l'on ne pratique une telle méthode que lorsqu'elle se justifie. Le *Botrytis cinerea* peut se développer dans tous les vignobles au cours des vendanges tardives, principalement dans les années pluvieuses. Mais les régions où l'on peut profiter des avantages de la pourriture noble pour augmenter la qualité des vins sont peu nombreuses. Sur les bords du Rhin, la pourriture noble est connue depuis longtemps (3) et on fait remonter vers 1800 les premières récoltes de raisins pourris. Dans le Sauternais, d'après LABORDE, c'est seulement vers la moitié du siècle dernier que l'on a commencé à faire des vins d'une manière générale avec le concours de la pourriture noble. Depuis, cette pratique s'est beaucoup répandue en Gironde, principalement le long des deux rives de la Garonne, au sud de Bordeaux. Souvent dans la région des Graves, région productrice de vins secs ou demi-secs, les producteurs laissent pourrir le raisin, mais c'est dans la région de Sauternes et les communes avoisinantes (1), et de l'autre côté de la Garonne, à Sainte-Croix-du-Mont, que la pourriture noble a, pour ainsi dire, son terrain d'élection. Dans les autres régions productrices de vins blancs, la pourriture des raisins est considérée comme dangereuse. Il en est toujours ainsi du reste pour les vins rouges, la pourriture aboutissant à la perte complète de la couleur. De même en Charente, elle revêt toujours la forme

(1) On sait que l'appellation Sauternes n'est donnée qu'aux vins provenant de cinq communes ; Sauternes, Bommes, Fargues, Preignac et Barsac.

vulgaire (4) et les eaux-de-vie préparées à partir de moûts pourris sont de mauvaise qualité. On s'est donc particulièrement occupé à la Station Viticole de Cognac (5) de rechercher un traitement des raisins en vue d'empêcher le développement de la pourriture lors des années propices aux invasions.

I. — Historique des connaissances sur la pourriture noble

Les premières recherches sur les modifications chimiques provoquées par la pourriture noble, semblent avoir été faites par NEUBAUER (6), en Allemagne, et datent de 1869. En 1888, MÜLLER-THURGAU (7) a publié une étude d'ensemble du sujet d'après des observations et des analyses faites à la récolte de 1883 et aux suivantes, dans les vignobles du bord du Rhin. Nous verrons qu'en ce qui concerne l'étude botanique, biochimique et œnologique de la pourriture noble, les travaux de cet auteur restent les plus importants.

Étude botanique de la pourriture noble

MÜLLER-THURGAU a montré que l'agent spécifique de la pourriture noble est *Botrytis cinerea* Pers. Dans la forme la plus courante de la pourriture du raisin, dite vulgaire, on peut constater parfois, à côté de *Botrytis cinerea*, l'apparition de *Penicilliums*, d'*Aspergillus* et de *Mucors*. Ces moisissures entrent en compétition avec *Botrytis cinerea*. Lorsque les *Penicilliums* dominent, ils provoquent la pourriture « verte » étudiée par MÜLLER-THURGAU. Lorsque l'humidité ou les pluies sont abondantes, le raisin se gonfle et éclate. Il peut alors être attaqué par des bactéries oxydantes, véhiculées très souvent par les insectes ; on observe alors une pourriture « acide ».

Le *Botrytis cinerea* est la forme conidifère de *Sclerotinia fuckeliana*, moisissure microscopique très répandue dans la nature. Elle vit en saprophyte sur un grand nombre de matières organiques et en parasite sur divers organes végétaux parmi lesquels les fruits et les raisins. Le mycélium du champignon observé au microscope lors de son développement sur le grain de raisin, montre des houppes constituées par de gros tubes se ramifiant au sommet sous forme arborescente. Lorsque le développement de la moisissure est assez avancé, on aperçoit aux extrémités ; des grappes très nombreuses formées de conidies. De ces conidies se détachent des spores ovoïdes. Lorsque les conditions sont favorables, ces spores germent en émettant des tubes mycéliens qui s'implantent dans la pellicule des grains sains.

Au point de vue botanique *Botrytis cinerea* a un cycle végétatif assez compliqué (8) donnant lieu à des phénomènes d'hétérocaryose (9). Une

conidie du type polynucléaire, donc hétérogénétique, peut donner trois types de spores : deux homotypes par suite d'une nouvelle division anormale, et un troisième hétérotype semblable à la conidie mère. De plus les tubes mycéliens originaires de différents types de spores, peuvent donner lieu, en se soudant, au phénomène d'anastomose et donner ainsi des combinaisons variées. BARNES (10) signale les variations de caractères morphologiques obtenues par élévation de température.

Récemment PESANTE (11) a étudié au point de vue morphologique et physiologique quelques souches de provenances diverses. Il conclut que le *Botrytis cinerea* ne doit pas être considéré comme une entité systématique génétiquement homogène. Au contraire nombreuses sont les variantes morphologiques et physiologiques rencontrées. Il n'a pas été possible de démontrer une corrélation entre les diverses activités et ceci peut être dû à l'existence de sous-espèces ou même à des phénomènes d'hétérocaryose par cellules polynucléaires capables de donner naissance à des phénotypes susceptibles de combinaisons variées.

Étude physiologique du *Botrytis cinerea*

Les travaux sur la physiologie du *Botrytis cinerea* ont eu pour origine deux préoccupations différentes : l'une reste dans le cadre de la physiologie générale des champignons, l'autre plus pratique que spéculative recherche dans ces travaux l'explication des faits observés lors du développement de la pourriture noble des raisins.

Les études se rapportant à la première catégorie sont très nombreuses et notre intention n'est pas d'en donner une analyse complète. Elles ont conduit à des monographies, tel que l'ouvrage de FOSTER (12). Comme toutes les moisissures, *Botrytis cinerea* possède un catabolisme oxydatif et est très riche en ferments de toutes sortes. RIPPEL et HEILMANN (13) ont montré que le gaz carbonique était non seulement un stimulant de la nutrition de *Botrytis cinerea* et des moisissures du même genre, mais aussi un véritable aliment. Cette propriété relie le métabolisme des hétérotrophes de celui des autotrophes. La fermentation citrique des oses par les moisissures a donné lieu à un grand nombre de travaux. Nous noterons ceux de CHRZASZCZ et de ses collaborateurs (14) qui ont observé la formation d'acide citrique par *Botrytis cinerea* à partir des acides acétique et lactique et de l'alcool éthylique.

Le nombre de diastases identifiées dans le mycélium de *Botrytis cinerea* est très grand. LABORDE, un des premiers, a établi la présence d'oxydases, qui conduisent au brunissement de la peau du raisin et qu'il dénommait « œnoxydase ». Elle n'est pas détruite par la fermentation alcoolique. Il s'agit en réalité d'un complexe de ferments oxydatifs parmi lesquels on a identifié la tanase ou polyphénoloxydase, la laccase, la

catalase, la glucoseoxydase, l'acide ascorbiqueoxydase. TOMBESI et FORTINI (15) ont déterminé, par un dosage chimique, la teneur en oxydase des raisins pourris ; ils ont développé les conséquences de sa présence dans les moûts de raisin, sur les phénomènes d'oxydoréduction au cours de la fermentation. *Botrytis cinerea* possède encore la pectase et la pectinase qui lui permettent d'hydrolyser les pectines (16), la protéase, l'uréase, etc. COLIN (16 bis) a consacré sa thèse de doctorat à l'étude particulière de l'hydrolyse des polysaccharides par *Botrytis cinerea*.

L'activité de *Botrytis cinerea* est surtout caractérisée par des combustions profondes du substrat. MÜLLER-THURGAU montra que *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin, consommait à la fois le sucre et l'acidité. Mais contrairement au *Penicillium*, les acides disparaissent beaucoup plus que les sucres. Parmi les acides du raisin, c'est principalement l'acide tartrique qui est attaqué. Ces faits ont été confirmés par BEHRENS (17). Cependant WINDISCH (18) indique que c'est surtout l'acide malique qui disparaît. Récemment GARINO-CANINA et ses collaborateurs (19) ont observé dans des cultures sur moûts de raisin et lors de la surmaturation des raisins servant à la vinification du « Passito di Caluso », une diminution de l'acide tartrique beaucoup plus forte que celle de l'acide malique.

LABORDE a constaté la formation de glycérol par le *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin (20). Il a remarqué que le glycérol formé dans les premiers jours de culture disparaissait par la suite. Il a de même reconnu la présence du glycérol dans les moûts provenant de raisins pourris. Le même auteur a montré que *Botrytis cinerea* forme dans le raisin ou dans son milieu de culture, un mucilage soluble : la dextrane.

Plus récemment SCHOEN et EKREM ERAS (21) ont signalé que *Botrytis cinerea* formait des quantités élevées de mannitol à partir du glucose.

Enfin, d'après les travaux de RIBÉREAU-GAYON, E. PEYNAUD et S. LAFOURCADE (22), les différentes souches de *Botrytis* se montrent capables de sécréter d'une part des substances antibiotiques pour la levure qui diffusent en grande partie dans le moût et se retrouvent encore dans le mycélium, d'autre part des substances accélérant la fermentation et favorisant la croissance, qui restent dans le mycélium lavé. Ces observations expliquent les irrégularités de fermentation des raisins plus ou moins pourris.

Étude œnologique de la pourriture noble

Dans son étude très étendue, MÜLLER-THURGAU a fait de nombreuses observations d'un intérêt œnologique certain pour la production des vins liquoreux. Il insiste sur le fait qu'il n'y a vraiment pourriture noble que lorsque *Botrytis cinerea* intervient sur des raisins très mûrs, même légèrement surmûris. Au cours de la pourriture le poids des grains pourris dimi-

nue constamment par perte d'eau ; grâce à cette concentration, la quantité de sucre contenue dans les moûts de raisins pourris est supérieure à celle des moûts de raisins sains. C'est en général l'inverse pour l'acidité : les raisins pourris sont moins acides ou ne sont pas plus acides que les raisins sains. Si l'on considère la quantité absolue de sucre d'une vendange saine, on constate toujours qu'elle est supérieure à celle d'une vendange pourrie ; il en est de même pour les acides libres. MÜLLER-THURGAU fut l'un des premiers à montrer que la grande densité des moûts pourris n'était obtenue que par une perte souvent importante du sucre, lorsqu'on envisage la totalité de la récolte.

D'après BEHRENS (23) l'action finale du *Botrytis* sur l'acidité des moûts est assez variable et dépend de la concentration, c'est-à-dire des conditions météorologiques, de l'intensité de la combustion des acides, de la date des vendanges, et surtout du moment où le *Botrytis* intervient.

VENTRE (24) pense également que « la pourriture est noble ou grise suivant le temps qu'il fait ». Cet auteur représente l'enrichissement du degré de sucre par le rapport $\frac{S - s}{V - v}$ dans lequel S est la quantité de sucre du raisin et s la quantité de sucre détruit par *Botrytis cinerea*, V le volume de jus de raisins et v l'évaporation de l'eau. Lorsque le temps est sec V — v devient faible tandis que s reste sensiblement constant. Il y a à ce moment concentration et amélioration de la qualité. Si le temps est humide, non seulement s augmente par suite du développement de la pourriture, mais il y a souvent entrée d'eau et finalement appauvrissement du moût en sucre.

D'après cet exposé de nos connaissances sur la pourriture noble, on se rend compte que les observations pour les grands vins blancs de Bordeaux sont relativement peu nombreuses. Les seules analyses connues sont celles que LABORDE a faites dans le Sauternais il y a plus de quarante ans, et dont voici extrait de son Cours d'Œnologie, un exemple des résultats :

	Cru n° 1			Cru n° 2		
	grains sains	grains pourris plein	grains rôtis	grains sains	grains pourris plein	grains rôtis
Sucre en g/l.....	230	263	385	220	230	339
Acidité en g/l.....	2,55	2,72	2,20	3,00	2,94	2,20

Au point de vue des transformations propres à chaque acide, nous avons vu que les conclusions restaient encore divergentes. D'autre part bien que PESANTE ait observé des différences morphologiques entre souches, il reste à étudier les possibilités de classification physiologique.

Du reste tout le comportement du *Botrytis cinerea*, et en particulier la production de glycérol et éventuellement de l'acide citrique, mériteraient d'être approfondis. Nous avons donc envisagé l'étude systématique de la physiologie de *Botrytis cinerea* et de la pourriture noble comportant des analyses détaillées et complètes exprimées sous forme de bilans. Dans une première série d'expériences nous avons tenté de préciser les transformations produites dans le moût de raisin servant de milieu de culture au *Botrytis cinerea*. Dans une deuxième série, nous avons suivi au vignoble les variations de la composition du raisin au cours de la surmaturation par la pourriture noble. Enfin, dans une troisième partie, nous avons relié la composition acidimétrique des grands vins du Sauternais aux phénomènes observés lors de la surmaturation par le *Botrytis*.

II. — Transformations produites par *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin

Nous avons disposé pour cette étude de 6 souches de *Botrytis cinerea* d'origines diverses. L'une d'elles a été isolée d'un raisin pourri, cueilli dans la région de Sauternes. Nous avons opéré cet isolement de la manière suivante : un fragment de pellicule d'une baie de raisin est prélevé et placé dans une boîte de PÉTRI, contenant du moût de raisin gélosé à 10 p. 100 et stérilisé. Après quelques jours de conservation à l'étuve à la température de 25°, on observe les premiers développements des tubes mycéliens, sous forme d'une houppe blanchâtre. A ce moment on prélève aseptiquement au fil de platine un peu de mycélium et on le transporte sur une autre boîte de PÉTRI. Par plusieurs repiquages, effectués de cette façon, on évite la présence de levures, et on obtient une souche homogène de *Botrytis cinerea*. On s'assure de l'absence de levures en cultivant la souche isolée sur milieu sucré liquide. On conserve les cultures sur moût gélosé, en tubes inclinés, ou en erlenmeyer sur moût liquide. Dans ce dernier cas, l'ensemencement se fait avec une suspension de spores. Dès que les conidies sont formées, ce qui est indiqué par la teinte grise que prend le mycélium, on agite la culture et les spores se détachent dans le liquide. On ensemente aseptiquement le milieu stérilisé avec quelques gouttes de cette suspension de spores. Au bout de quelques jours, il apparaît en surface de très nombreuses taches blanches. Ces taches se développent et la surface du moût se recouvre rapidement d'un voile épais et touffu, sorte de feutrage qui continue à s'épaissir en formant une membrane que la dextrane rend visqueuse à la partie inférieure immergée. D'abord blanc, le mycélium devient rapidement grisâtre par formation de conidies. Suivant les souches de *Botrytis cinerea*, il existe du reste des variantes à cet aspect. Les cultures s'effectuent également très bien sur moût de bière, avec un développement un peu plus rapide.

Les autres souches qui ont servi à nos études, proviennent de raisin blanc, de pomme et du fruit de *Diospyros kaki* ; nous les devons à l'Institut de microbiologie de Pérouse (Prof. T. CASTELLI). Deux autres souches, *Botrytis cinerea* Pers. et *Botrytis cinerea* Pers. *albino sclerotia*, nous ont été fournies par le Centraalbureau voor Schimmelcultuur de Baarn (Prof. KLUYVER). Pour la facilité de l'exposé, nous désignons ces souches dans le texte et dans les tableaux par les numéros suivants :

- N° 1. — Souche isolée de raisins de Sauternes.
- N° 2. — Souche isolée de raisin blanc.
- N° 3. — Souche isolée de pomme.
- N° 4. — Souche isolée du fruit de *Diospyros kaki*.
- N° 5. — *Botrytis cinerea* Pers.
- N° 6. — *Botrytis cinerea* Pers. *albino sclerotia*.

Ces souches étaient conservées par repiquages fréquents sur moût de raisin, dès la formation de conidies. Elles se développent très bien sur moût de raisin, bien qu'un peu plus lentement pour les souches N° 3 et 4. La souche N° 4 donne des cultures de couleur très foncée, presque noires lorsqu'elles vieillissent ; par contre la souche N° 6 reste toujours blanche.

Nos expériences sur la transformation du moût de raisin par ces souches ont été effectuées dans des ballons sphériques d'un litre, à col large et court, obturés par un épais tampon d'ouate. Le diamètre du col étant de 5 à 6 cm, les échanges gazeux avec l'air extérieur se font facilement. On se trouve par conséquent toujours dans des conditions d'aérobiose suffisante et le manque d'oxygène n'est jamais un facteur limitant. La quantité de moût de raisin utilisée était de 400 cm³ représentant une épaisseur de liquide de 5 à 6 cm. Le *Botrytis* se développait à la surface du moût, nous n'avons jamais fait de cultures immergées.

Pour ne pas surcharger notre exposé de tableaux de chiffres, nous commenterons ici, à titre d'exemple, les résultats obtenus dans deux cas extrêmes. Dans une première série d'essais, qui fut par la suite souvent répétée, on a suivi par l'analyse détaillée la transformation, en fonction du temps, de moûts de raisin servant de milieux de cultures à quatre souches. Deux moûts d'origines et de compositions différentes ont servi à ces essais. L'un est un moût de raisins rouges, préparé par nous-même, titrant 11°5 Baumé et présentant une acidité de titration très élevée : 7,35 g en acide sulfurique pour un pH de 2,98, conservé par pasteurisation en bouteilles bouchées de liège. L'autre est un moût de raisin blanc, muté à l'ac de sulfureux, qu'on désulfite avant l'emploi, pesant 14°5 Baumé et caractérisé par une acidité de titration très basse : 2,25 g et un pH de 3,75.

Pour chaque souche, on ensemeince plusieurs ballons, exactement dans les mêmes conditions, de façon à avoir des développements bien

TABLEAU IV

Cultures de différentes souches de Botrytis cinerea

Moût de raisins rouges : 11°5 et 7,35 d'acidité de titration

Nombre de jours de culture	Poids mycélium g	Sucres g	pH	Acidité totale	Alcalinité des cendres	NH ₄	Somme des cations	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Somme des anions	Différence
COMPOSITION DU MOÛT DE CULTURE												
		209	2,98	169	34	2,6	206	120	81	3,2	204	— 2
SOUCHE N° I												
13	3,7	160	3,06	100	29	0,2	129	73	57	2,6	133	4
18	4,8	150	3,2	72	32	0,2	104	53	44	2,7	100	4
38	7,5	131	4,18	13,5	38	0	51	30	22	2,4	54	3
SOUCHE N° II												
13	4,4	172	3,01	117	32	0,2	149	94	60	2,8	157	8
18	5,0	152	3,51	104	32	0,1	136	81	48	5,1	134	2
38	7,7	131	3,51	58	37	0	95	43	41	5,4	89	6
SOUCHE N° III												
13	4,4	174	3,02	132	37	0,3	169	95	65	5,6	166	3
18	4,6	153	2,95	131	33	0,2	164	89	61	11,6	162	2
38	7,3	123	3,10	110	37	0	147	64	43	27,5	134	13
SOUCHE N° V												
13	4,9	151	3,22	77	42	0	119	52	32	16,5	100	19
18	6,5	131	3,50	60	36	0	96	36	26	20	82	14
38	9,0	101	4,20	23,5	34	0	57	4	0	27	31	26

Sauf indication spéciale les chiffres sont des milliéquivalents par litre.

TABLEAU V

Cultures de différentes souches de *Botrytis cinerea*

Moût de raisins blancs : 14,5 et 2,25 g d'acidité de titration

Nombre de jours de culture	Poids mycélium g	Sucre g	pH	Acidité totale	Alcalinité des cendres	NH ₄	Somme des cations	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide acétique	Somme des anions	Différence
COMPOSITION DU MOÛT DE CULTURE													
SOUCHE N° I													
10	4,5	221	3,79	27	48	0,6	76	35	18	4	0	57	19
20	8,5	209	4,03	27	50	0,6	78	23	13	6	3	45	33
30	12	174	4,17	21	49	0,4	70	18	12	8	0	38	32
40	17	158	4,82	16	49	0,2	65	9	9	14	2	34	31
SOUCHE N° II													
10	4	218	3,42	39	48	1,0	88	48	23	5	0	76	12
20	9	170	3,70	60	42	0,7	103	36	11	12	1	60	43
30	14	158	—	67	50	0,6	118	29	10	17	2	58	60
40	24	135	3,72	74	45	0,4	119	14	9	29	1	53	66
50	28	124	3,35	97	50	0,2	147	8	8	26	2	44	103
SOUCHE N° III													
10	5	228	3,40	45	48	0,9	94	50	22	5	0	77	17
20	8	175	3,24	89	55	0,6	144	37	15	36	1	89	55
30	14	152	3,38	115	51	0,4	166	38	12	36	2	88	78
40	20	137	3,39	97	52	0,4	149	18	11	38	1	68	81
SOUCHE N° V													
10	2	242	3,70	42	47	1,1	90	48	24	4	2	78	12
20	5	203	3,67	44	46	0,7	91	30	20	9	3	62	29
30	10	180	3,67	55	47	0,6	103	21	17	13	1	52	51
40	15	158	3,42	67	51	0,3	118	17	14	20	2	53	65
50	23	139	3,38	96	51	0,2	147	9	12	24	0	55	92

Sauf indication spéciale les chiffres sont des milliéquivalents par litre.

parallèles. Après divers temps de culture notés à partir du moment où le mycélium commence à se développer on décante le liquide d'un ballon, on le filtre et on procède à l'analyse de ce moût. Les cultures des derniers ballons ont duré 40 à 50 jours, à la température de 22° environ.

Les tableaux IV et V donnent les résultats obtenus en ce qui concerne l'évolution des sucres réducteurs et des acides organiques. On indique le poids du mycélium récolté sur les 400 cm³ de jus, après séchage à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant, qui donne une idée de l'importance du développement.

Combustion des sucres

On observe que les teneurs en sucres réducteurs diminuent constamment durant la culture. En 40 jours la moitié du sucre initial a disparu. L'importance de cette combustion est assez bien en rapport avec le développement du mycélium. Sur le moût de raisin acide, où la croissance du mycélium est plus faible et semble limitée par un taux d'azote insuffisant, les quatre souches étudiées se comportent de la même façon, elles utilisent les mêmes quantités de sucre pour une récolte de mycélium du même ordre. Sur le moût de raisin peu acide, les poids secs de *Botrytis* sont beaucoup plus élevés et la diminution du sucre beaucoup plus forte. Ici, les souches se différencient et ce sont celles qui se développent le plus abondamment qui font disparaître la plus grande quantité de sucre. Ceci est, du reste, logique puisque sur moût de raisin *Botrytis cinera* prend surtout l'énergie nécessaire à son développement dans la combustion respiratoire des sucres. On peut calculer qu'il a fallu suivant les diverses conditions de 3 à 5 g de sucre pour former 1 g de mycélium sec.

Les dosages individuels de glucose et de lévulose au polarimètre, que nous n'avons pas reportés dans les tableaux, montrent que c'est le glucose qui est brûlé de préférence. Le rapport glucose / lévulose diminue régulièrement. Pour un moût, il passe de 0,87 à 0,72 après un mois de culture, et pour un autre de 1,03 à 0,76. Ces résultats confirment donc entièrement les observations faites par d'autres auteurs à ce sujet. C'est d'ailleurs une loi qui ne présente que peu d'exceptions, que le glucose est métabolisé par les cellules par fermentation ou respiration, plus facilement que le lévulose.

Évolution de l'acidité de titration

Cette évolution est extrêmement variable d'une souche à une autre ; elle dépend aussi beaucoup de l'acidité totale du milieu. Sur moût acide, la souche N° 1 détruit la presque totalité de l'acidité en 38 jours de culture. L'acidité de titration passe de 169 méq à 13,5 méq seulement, tandis que dans les mêmes conditions, la souche N° 3 laisse encore 113 méq par litre

d'acidité. Les souches se classent dans l'ordre décroissant suivant en ce qui concerne la combustion des acides : n° 1, n° 5, n° 2, n° 3.

L'allure du phénomène est tout autre avec le moût pauvre en acidité. Seul le *Botrytis* N° 1 a continué à faire baisser l'acidité ; tandis qu'elle remonte plus ou moins vite avec les autres souches, pour être doublée, et dans un cas même presque triplée, après 30 à 40 jours de culture.

En résumé, sur moût de pH bas, il y a eu toujours désacidification ; sur moût de pH élevé, il y a eu généralement acidification, et ces variations en sens inverse, peuvent avoir une grande amplitude. On conçoit dès maintenant qu'il peut exister au vignoble des souches qui font baisser l'acidité du raisin, tandis que d'autres, acidogènes, conduisent à un autre genre de pourriture en augmentant l'acidité. Ceci permet d'expliquer les données contradictoires de plusieurs auteurs et permet de comprendre aussi que la pourriture des raisins, par la grande diversité des conditions, peut produire des effets diamétralement opposés.

Combustion des acides tartrique et malique

Ces deux acides du moût de raisin sont fortement attaqués, et, ce qui est important à souligner, à peu près dans les mêmes proportions. Si l'on trace les courbes de l'évolution de ces deux acides, on obtient des tracés parallèles. Ceci semble en désaccord avec ce qui a été indiqué par d'autres auteurs et avec ce que nous observerons au prochain paragraphe dans les analyses comparatives de raisins sains et pourris, desquelles il ressort que c'est l'acide tartrique qui disparaît beaucoup plus vite que l'acide malique. Nous essaierons plus loin de donner une explication à ces contradictions.

Après 20 jours de culture ces deux acides ont diminué en moyenne de moitié et c'est là la cause de l'abaissement de l'acidité totale enregistrée. Chaque souche montre cependant un comportement différent. C'est la souche N° 5 qui paraît à ce point de vue la plus active ; après 38 jours la teneur en ces acides est ramenée pratiquement à zéro, dans un cas où au départ il y avait respectivement 120 et 81 méq par litre des acides tartrique et malique. La souche N° 2, par contre, est celle qui attaque le moins ces acides, puisque dans les mêmes conditions, elle n'a diminué leur taux que de 50 p. 100.

Dans les conditions de la pourriture du raisin au vignoble, la durée de l'attaque n'excède pas une dizaine de jours. Ce délai a été suffisant dans nos cultures pour abaisser de 20 à 50 p. 100 le taux de ces deux acides.

Formation d'acide citrique

Sur moût de raisin peu acide, on observe que la formation d'acide citrique a été générale, la souche N° 3 a produit 34 méq de cet acide, soit

plus de 2 g par litre ; la souche N° 1 forme des quantités plus faibles, mais encore importantes.

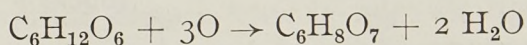
Très différent est le comportement du *Botrytis* sur le moût de raisin acide. Ici l'acidogénèse est beaucoup plus faible. Si les souches N° 3 et 5 forment encore 24 méq d'acide citrique, la formation est très limitée avec la souche N° 2 et tout à fait nulle avec la souche N° 1.

La production d'acide citrique est donc d'abord une caractéristique de la souche de *Botrytis* ; elle est exaltée par une culture à pH élevé.

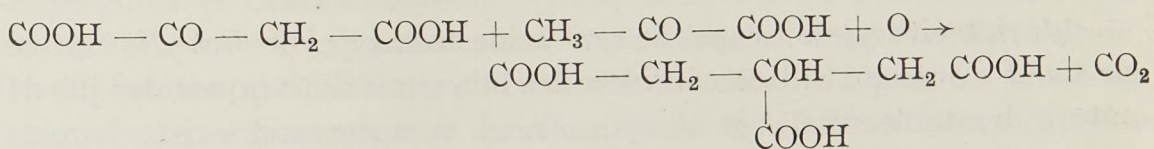
On a l'explication de l'évolution de l'acidité de titration commentée dans un paragraphe précédent et on comprend les résultats contradictoires obtenus par les auteurs qui ont étudié cette question, en particulier, BLAREZ, DENIGÈS et GAYON (25).

Depuis les travaux de WEHMER qui en 1893 découvrit l'acide citrique à côté de l'acide oxalique, dans des cultures de champignons, on sait que beaucoup de moisissures forment de l'acide citrique par oxydation des sucres. Les genres suivants ont été reconnus capables de produire cet acide : *Cytromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucors*, etc. Le pouvoir citrogène d'*Aspergillus niger* est utilisé sur une grande échelle dans la fabrication industrielle de l'acide citrique. CHRZASZCZ et LEOHARD (14) ont également montré que *Botrytis cinerea* est un organisme producteur d'acide citrique en milieu simple. Ce caractère est certainement une des formes les plus courantes du catabolisme des champignons, parce qu'il est lié aux phénomènes respiratoires, et qu'il est une conséquence de l'universalité du cycle tricarboxylique.

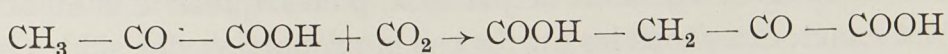
L'équation globale de la formation de l'acide citrique par oxydation des sucres est la suivante :



Comme dans la fermentation, le premier stade de cette oxydation aboutit, à partir des triosephosphates à l'acide pyruvique. D'après le cycle de KREBS, l'acide citrique provient de la condensation de l'acide pyruvique et de l'acide oxalacétique.



L'acide oxalacétique proviendrait lui-même de la carboxylation directe de l'acide pyruvique :



Nous avons étudié, dans de nombreux essais, la formation de l'acide citrique par *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin. La figure 4 donne les courbes de la formation d'acide citrique par 6 souches. Les souches étudiées se classent deux par deux. Ici encore les souches N° 3 et 5 produisent

le plus d'acide citrique ; c'est un caractère de ces souches qu'on retrouve dans tous les essais. Le taux maximum qui atteint 60 méq par litre, est obtenu après 40 jours de culture ; par la suite la teneur en acide citrique commence à diminuer, car il est lui-même oxydé. Les souches N° 2 et 6 donnent des quantités moyennes d'acide citrique. Enfin les souches N° 1 et 4 n'en forment pas.

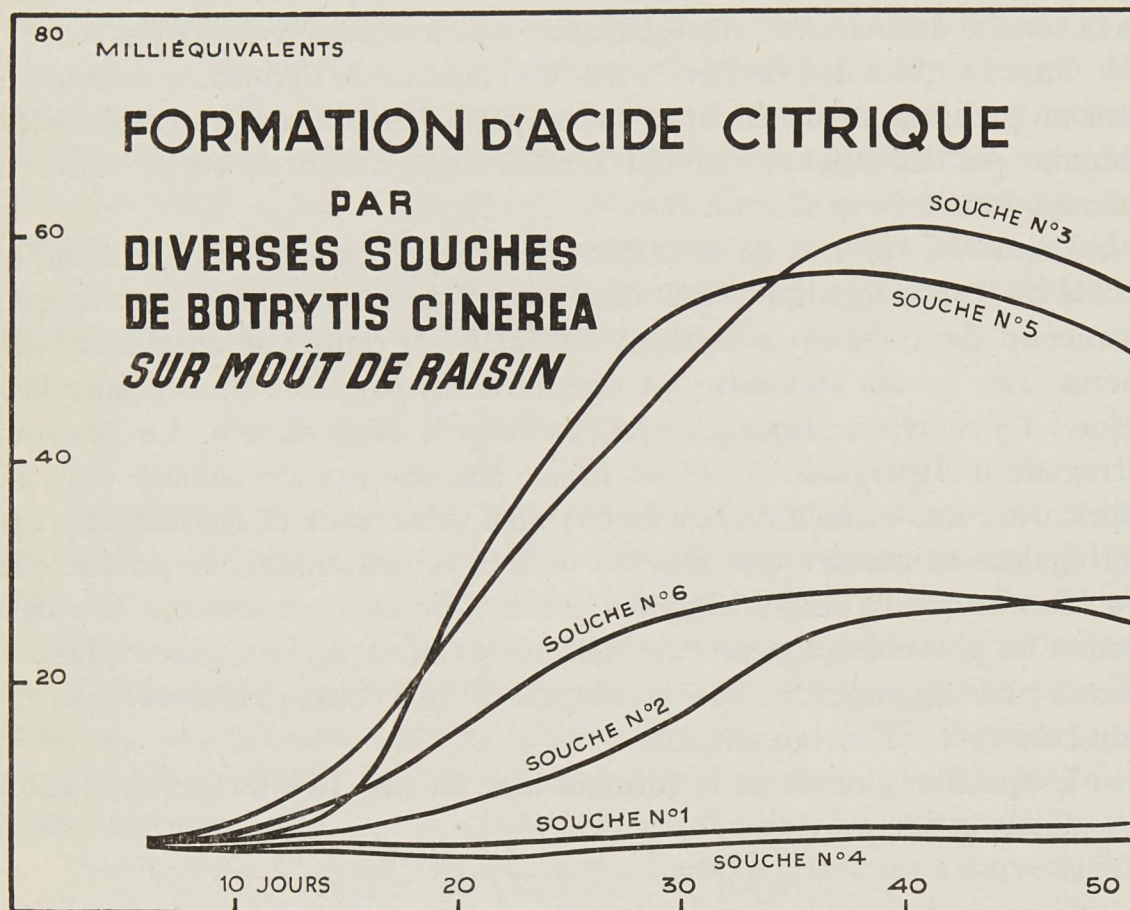


FIG. 4.

Formation d'autres acides

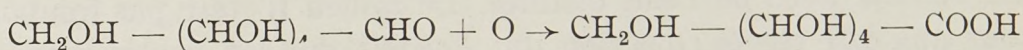
L'acide citrique n'est pas le seul acide formé par le *Botrytis* cultivé sur moût de raisin. Si l'on considère les bilans acidimétriques des jus de culture des tableaux IV et V, on se rend compte qu'il existe le plus souvent des acides organiques qui n'ont pas été dosés, puisque la somme des anions est inférieure à la somme des cations. Mis à part le cas de la souche N° 1, cultivée sur moût de pH 2,98, pour laquelle le bilan acidimétrique est exact, dans tous les autres cas la proportion des acides indosés est importante. Dans une culture très longue ces acides atteignent jusqu'à 103 méq pour une somme globale de cations égale à 147 méq. Ici les deux tiers des acides du moût pourri sont inconnus. La formation de ces acides inconnus est parallèle à celle de l'acide citrique. C'est dans les conditions

et avec les souches qui forment le plus d'acide citrique, qu'on observe dans les bilans les déficits les plus importants.

Nous avons cherché tout d'abord les acides volatils, signalés par les auteurs polonais (14), et qu'on retrouve du reste toujours en quantité plus ou moins abondante dans les moûts de raisins pourris. Le dosage était pratiqué par entraînement à la vapeur et les chiffres trouvés sont reproduits dans le tableau II. Les doses trouvées n'ont jamais dépassé 3 méq par litre. Cette recherche appliquée à un grand nombre de cultures, n'a toujours montré la présence d'acides volatils qu'à l'état de traces.

Ces acides ne constituant pas la fraction indosée, nous avons été conduit à rechercher l'acide gluconique, qui a été souvent signalé dans les milieux de culture de différentes moisissures. Pour cette recherche dans un milieu aussi riche en sucre, nous avons dû mettre au point une nouvelle technique de dosage de cet acide, qui a été décrite dans la première partie.

La découverte de l'acide gluconique dans les cultures d'*Aspergillus niger* est due à MOLLIARD (26) qui observa que les acides citrique et oxalique, toujours présents dans le liquide de culture, ne correspondaient pas quantitativement à l'acidité totale de la solution. L'acide gluconique provient de la simple oxydation en groupement carboxyle, de la fonction aldéhyde du glucose :



En 1926, MULLER (27) montra que cette oxydation se faisait par l'intermédiaire d'une diastase agissant comme une oxydase. Cette enzyme, qui a donné lieu à un grand nombre d'études récentes, a été appelée glucose-oxydase. Elle est connue encore sous le nom de notatine, antibiotique agissant par libération d'eau oxygénée. L'enzyme est un ferment jaune typique, du groupe des flavoprotéines.

On reconnut plus tard que la formation d'acide gluconique était la propriété d'un grand nombre de champignons et en particulier des *Aspergillus* et des *Penicilliums*. Quelques *Mucors*, *Dematiiums* et *Fusariums* ont encore été signalés comme organismes produisant cette réaction. Il est évident que cette propriété est extrêmement répandue parmi les champignons filamenteux et qu'elle dépasse les limites des espèces précitées. *Botrytis cinerea* ne paraît pas avoir été expérimenté à ce sujet.

Nous avons recherché l'acide gluconique dans les moûts ayant servi de culture à *Botrytis cinerea*. Nos résultats ont toujours été positifs et tous les moûts, dès les premiers jours de culture, contiennent cet acide. Cependant nous n'avons pu mettre en évidence que des doses relativement faibles de l'ordre de 3 à 4 méq par litre. Ces faibles formations s'expliquent vraisemblablement par les conditions de pH de nos cultures. Le pH optimum d'activité de la glucose-oxydase est voisin de 6. Au-dessous de pH 3, la

glucose-oxydase est inactive. Nous nous trouvons donc dans les moûts de raisin dans la zone de très faible oxydation du glucose par cette enzyme.

La présence de l'acide gluconique ne peut donc pas résoudre le problème des acides indosés. Toutefois, nous verrons plus loin l'importance de cet acide dans les raisins attaqués par la pourriture noble sur le cep. Son existence dans les vins caractérise avec certitude ceux qui proviennent de raisins pourris.

Par ailleurs la recherche d'autres acides d'origine fongique en particulier de l'acide oxalique, a été négative. Le *Botrytis cinerea* forme dans des cultures prolongées sur moût de raisin des acides organiques que nous n'avons pu identifier.

Influence du pH des milieux de culture sur l'évolution des acides

Les grandes différences observées dans les comportements des cultures sur jus de raisin acide et sur jus de raisin d'acidité faible nous ont conduit à étudier systématiquement les modifications apportées par des variations importantes du pH des moûts de culture. L'augmentation du pH du moût de raisin naturel s'obtenait par addition de soude, la diminution du pH par addition d'acide sulfurique. Pour avoir partout la même concentration des constituants, on ajustait les moûts ainsi modifiés, au même volume avec de l'eau distillée. Le milieu n'était pas tamponné, surtout aux pH élevés ; l'action du *Botrytis* sur les acides a modifié profondément le pH de départ. Cependant, ces différences de concentrations en ions H^+ au début de la culture, ont suffi à influencer profondément le comportement du *Botrytis*.

Au départ la teneur en sucres était de 223 g par litre, et les taux des acides tartrique, malique et citrique, respectivement 51, 45 et 43 méq. Les cultures furent poursuivies à l'étuve à 22° ; elles ont duré 45 jours à dater du jour de l'ensemencement. Après ce délai, le moût était décanté, filtré et soumis à l'analyse.

Dans le tableau VI nous donnons les résultats de ces dosages pour les souches N° 1 et N° 3, qui ont fait preuve des caractères physiologiques les plus différents.

Les souches de *Botrytis* n'ont pu se développer au-dessous de pH 2,3 et jusqu'à pH 2,6 la croissance a été difficile. Au-dessus de cette valeur, les développements sont rapides et les poids de mycélium récoltés sont un peu plus élevés qu'à la neutralité. La quantité de sucre brûlée est maximum pour les deux souches entre pH 3,0 et 4,0 ; cependant les écarts d'un pH à un autre sont faibles et ne dépassent pas 15 à 25 g de sucre.

L'évolution des acides a été beaucoup plus largement influencée par les conditions de pH. La combustion des acides tartrique et malique est d'autant plus importante que le pH de la culture est plus bas. A pH 2,6,

90 p. 100 de ces acides ont été brûlés par la souche N° 1 ; à pH 7,0, à peine 15 p. 100 ont subi le même sort. Il en est de même, quoique d'une manière moins accusée, avec la souche N° 3. Remarquons encore ici qu'à tous les pH la diminution des deux acides a été exactement parallèle. En culture sur milieu homogène il n'y a pas d'action sélective du *Botrytis* vis-à-vis de l'acide tartrique ou de l'acide malique.

TABLEAU VI

*Influence du pH sur les transformations du moût de raisin
par Botrytis cinerea*

pH initial	2,6	3,06	3,47	4,03	4,70	5,81	7,0
Acidité initiale.....	120	101	87	47	23	6	0
<i>Souche n° 1</i>							
Sucre consommé	93	106	114	95	93	85	88
pH final	2,63	3,93	4,87	5,49	5,67	5,70	5,37
Acidité totale	30	33	22	0	0	0	0
Acide tartrique.....	6,2	10,3	18,2	25	39	44	45
Acide malique	5	6	7	13	22	27	38
Acide citrique	1,5	3,8	5,7	7,5	15	18	22
<i>Souche n° 3</i>							
Sucre consommé	89	96	98	98	92	83	83
pH final	2,89	3,03	3,27	3,60	3,76	3,80	3,74
Acidité totale	37	36	49	43	44	76	61
Acide tartrique	14	11	15	20	27	30	31
Acide malique	6	6	12	14	27	34	30
Acide citrique	4,2	8,2	39,8	59	68	84	89

La formation de l'acide citrique est sous la dépendance étroite du pH. Comme il est connu pour d'autres moisissures, c'est aux pH élevés que l'acidification est maximum. La souche N° 3 arrive à une formation de 85 méq d'acide citrique, soit 5,5 g par litre. La souche N° 1 toujours moins citrogène, ne donne que 1,4 g. Si l'on considère que précisément cette acidification a fait baisser le pH de départ, il est vraisemblable que les taux d'acide citrique formés auraient été beaucoup plus élevés en milieu tamponné. Par contre en milieu très acide la combustion de cet acide peut l'emporter sur sa formation, et l'acide citrique diminue.

Ces évolutions différentes des acides aux divers pH se sont traduites par des modifications d'acidité de titration d'encore plus d'amplitude. A pH 2,6 l'acidité de titration a baissé de 90 méq pour la souche N° 1, tandis qu'elle n'a pratiquement pas été modifiée à pH 7,0. Pour la souche N° 3, les variations sont encore plus considérables, puisqu'on enregistre une diminution de 83 méq à pH 2,6 et une augmentation de 61 méq à pH 7,0. En somme la physiologie du *Botrytis cinerea* est telle qu'il acidifie les milieux de culture, lorsqu'ils sont neutres, et qu'il les désacidifie, au contraire, lorsqu'ils sont acides.

Formation de glycérol

LABORDE a découvert le premier (20) une production constante de glycérol par *Botrytis cinerea*. Son attention avait été attirée par les proportions importantes de glycérol que présentent les vins de Sauternes. Voici exprimés en grammes par litre, les résultats qu'il a obtenus en cultivant le *Botrytis*    l'état pur sur des moûts de raisin stérilisés.

	Moût n�� 1		Moût n�� 2	
	sucre restant	glycérol	sucre restant	glycérol
Moût primitif,.....	172			
	151	0	300	0
1��r dosage.....	122	5,7	217	15,8
2��e ��.....	80	7,4	178	11,7
3��e ��.....	10	5,2	—	—
4��e ��.....		2,3	—	—

On voit que la quantité de glycérol produite dans le moût augmente dans les premiers temps de l'action du *Botrytis*, atteint un maximum et diminue par la suite.

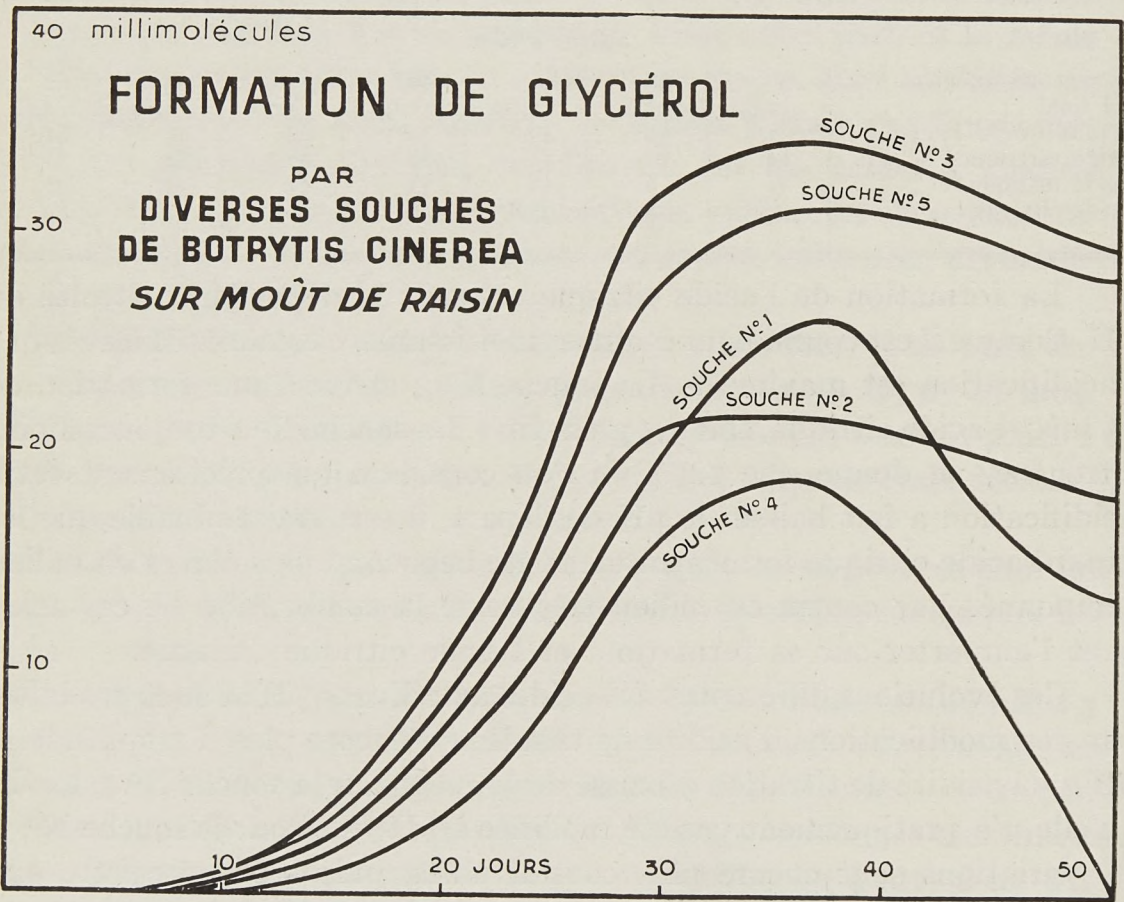


FIG. 5.

Nous avons suivi de la même façon la formation de glycérol par nos diverses souches. La figure 5 a été tracée avec les résultats obtenus sur

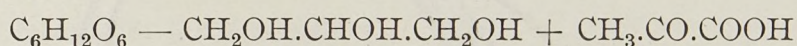
moût de raisin de faible acidité et de richesse en sucre élevée. Le tableau VII donne les exemples d'autres essais, effectués sur moût de raisin de pH voisin de 3,0.

Les quantités de glycérol formées dans nos cultures sont un peu inférieures à celles indiquées par LABORDE. Cette récolte plus faible peut tenir à d'autres conditions d'expérimentation ; en particulier le rapport de la surface du mycélium du volume du moût de culture pouvait être différent dans les expériences de LABORDE et dans les nôtres. Les productions les plus fortes que nous ayons enregistrées, atteignent 7 g par litre sur moût acide et 3 g seulement sur moût peu acide. Par ailleurs l'allure du phénomène est celui indiqué par LABORDE. Les courbes passent par un maximum lorsque 50 à 100 g de sucre ont disparu.

Les souches N° 1 et N° 5 se sont montrées les plus glycérrogènes, mais on note des différences de comportement d'une même souche lorsqu'on change de milieu. La courbe de formation de la souche N° 6 qui a été également étudiée se confond avec celle de la souche N° 2 et n'a pas été reportée sur le graphique.

D'un autre côté il n'existe aucune relation apparente entre les propriétés particulières d'une souche de former du glycérol et de former de l'acide citrique.

La production de glycérol avait été observée pour d'autres moisissures, notamment par BIRKINSHAW et ses collaborateurs, pour des *Aspergillus*, des *Helminthosporium* et des *clasterosporium* (28). TAKAHASHI et ASAI (29) ont trouvé avec les *Mucors* des quantités de glycérol pouvant atteindre 9% en poids du sucre décomposé. En ajoutant du sulfite au milieu de culture en milieu neutre, ces auteurs captent de l'éthanal et obtiennent des rendements en glycérol allant jusqu'à 23 p. 100 du sucre (30). On admet donc que le mécanisme de la formation aérobie du glycérol par les moisissures est identique à celui de sa formation au cours de la fermentation anaérobie des sucres. Il y aurait une véritable dégradation glycéropyruvique du sucre :



L'acide pyruvique serait métabolisé alors que le glycérol s'accumule.

TABLEAU VII

Formation de glycérol dans des cultures de Botrytis cinerea sur moût de raisin
Teneurs exprimées en millimolécules par litre

Durée de culture	Souche n° 1	Souche n° 2	Souche n° 3	Souche n° 5
13 jours	69,0	36,7	17,0	77,0
18 jours	72,0	40,7	40,5	70,0
38 jours	40,5	46,5	—	—

Influence du pH sur la formation du glycérol

Dans l'essai relatif à l'influence du pH sur l'action du *Botrytis* sur les acides organiques, dont nous avons tiré le tableau III, nous avons également dosé le glycérol formé après 45 jours de culture. Ces dosages nous ont donné les résultats suivants, exprimés en millimolécules par litre :

pH de culture	Souche n�� 1	Souche n�� 3
2,60	27	52
3,06	23	20
3,47	7	7
4,03	0	3
4,70	0	0
5,81	0	0
7,00	0	0

En fin de culture, on ne trouve de glycérol qu'aux pH les plus bas ; il n'y a pratiquement plus de glycérol au-delà de pH 4,0. Afin de savoir

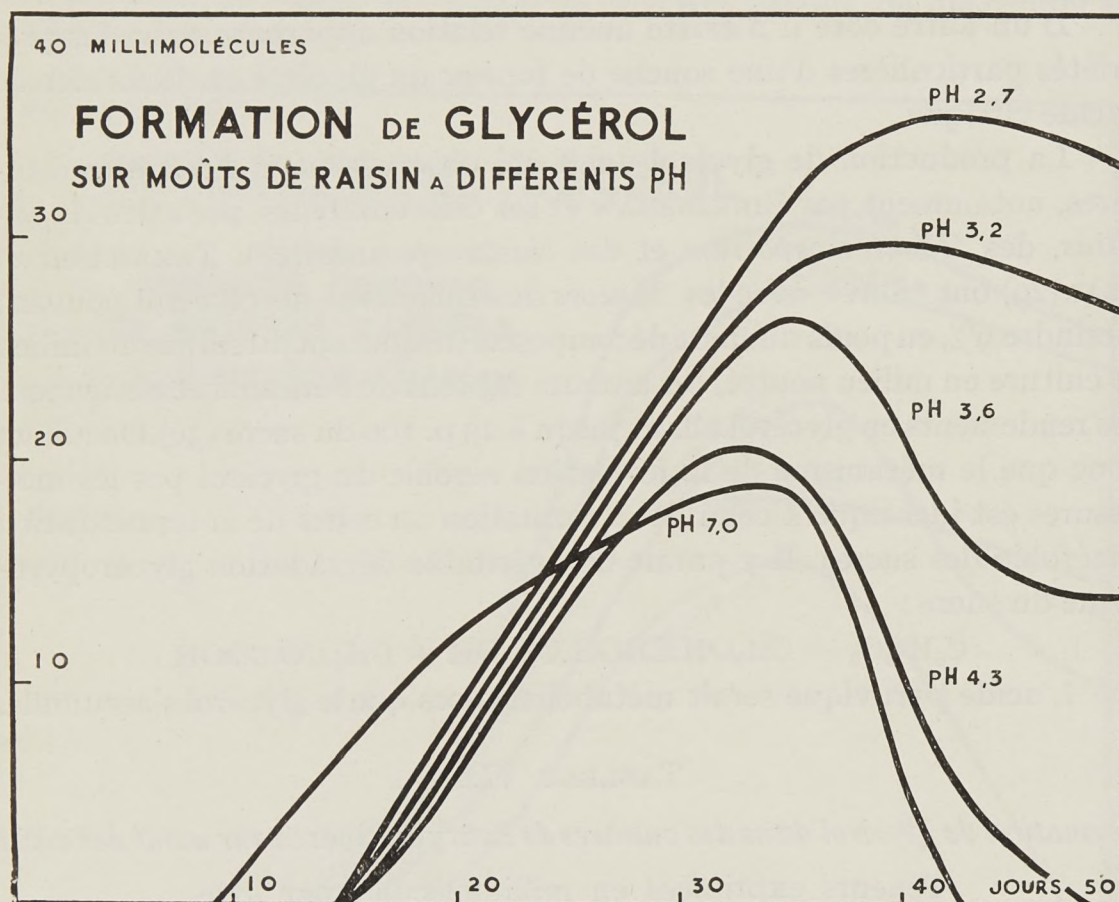


FIG. 6.

si l'absence de ce polyalcool tient à un manque de formation ou à sa disparition en fin de culture, nous avons suivi périodiquement les quantités de glycérol formées par la souche N   1 cultivée sur moût de raisin de différents pH. La figure 6 reproduit l'allure du phénomène.

Dans les premiers jours de culture les quantités de glycérol formées sont du même ordre. Cependant on note tout au début à pH 7,0 une formation un peu plus élevée. La glycérogenèse paraît peu influencée par le pH de culture ; peut-être cependant un pH élevé la favorise-t-elle. Mais c'est après 25 à 30 jours que les cultures à différents pH se diversifient. Le glycérol diminue d'autant plus vite que le pH est plus élevé. Il tombe rapidement à zéro à pH 7,0 et même à pH 4,3. Par contre, il ne diminue que très peu à pH 2,7. Les courbes de formation passent par un maximum après 30 à 40 jours.

Il ne paraît pas possible d'établir une relation précise entre la formation de glycérol et l'évolution des autres constituants. Alors que les acides tartrique et malique sont brûlés le plus intensément en milieu acide, la combustion du glycérol est maximum en milieu neutre. De la comparaison des figures 4 et 5, il semble qu'on puisse inférer que les souches les plus citrogènes forment aussi le plus de glycérol, mais ce classement n'est pas absolu : certaines souches dans certaines conditions donnent du glycérol et ne donnent pas d'acide citrique. D'autre part, c'est dans les conditions où l'acide citrique est le plus élevé que la production finale de glycérol paraît la plus faible.

Différenciation physiologique des souches de *Botrytis cinerea*

Au cours des expériences précédemment décrites, nous avons observé que le comportement des souches étudiées diffère sensiblement. Certes, dans les grandes lignes, on reconnaît aux diverses variétés de *Botrytis* les mêmes propriétés d'ensemble, mais elles se différencient dans l'intensité de certaines transformations et notamment dans leur pouvoir de formation du glycérol et surtout de l'acide citrique. Cette dernière propriété caractérise vraiment les souches et nous avons pu classer les six *Botrytis* étudiés en trois groupes, suivant l'importance de l'acidification qu'ils provoquent.

Il semble exister sur les raisins, dans les différentes régions vinicoles de la Gironde, et même dans le cadre d'une seule appellation, une infinité de variétés de *Botrytis*, dont l'action paraît être très différente et parfois même absolument opposée. Une étude sur les bases analytiques qui ont été exposées et une classification de ces variétés s'imposent pour mieux comprendre les résultats de l'évolution de la pourriture du raisin. Il n'est pas douteux que ce soient surtout les conditions atmosphériques qui font le départ entre la pourriture noble et la pourriture grise, avec du reste tous les intermédiaires que ces deux états peuvent comporter. Mais vraisemblablement les *Botrytis* qui se développent à Sauternes et produisent des raisins « rôtis », appartiennent à des variétés différentes de celles qui envahissent le Médoc ou détériorent les raisins du Blayais.

* * *

La technique des cultures pures nous a donc permis de saisir et de chiffrer plusieurs aspects de la physiologie du *Botrytis cinerea* se développant à la surface du moût de raisin. En particulier la combustion des sucres et des acides tartrique et malique a été mise en évidence ; d'autre part, les formations de glycérol, d'acide citrique et d'acide gluconique ont été observées.

Ces phénomènes vont nous permettre de comprendre les transformations profondes de la composition du raisin que provoque la pourriture noble.

III. — Etude de la surmaturation du raisin par la pourriture noble

Cette étude a été commencée aux vendanges de 1950, par des analyses comparatives de grains de raisins mûrs, mais parfaitement sains, et de grains pourris arrivés au stade « rôti ». On a opéré sur les raisins de trois vignobles ; les cépages auxquels ils appartenaient étaient ceux qui constituent la base de l'encépagement du Bordelais : le Sémillon et le Sauvignon. Les baies saines et les baies pourries étaient prélevées sur les mêmes grappes. Par simplification, on n'a pas différencié les cépages. Les moûts obtenus correspondaient donc à un mélange de Sémillon et de Sauvignon.

En 1951, nous avons suivi le développement de la pourriture noble au vignoble. A différentes époques et dès qu'apparurent les premiers raisins pourris, des analyses détaillées et des bilans acidimétriques ont été établis sur les moûts de raisins pourris et de raisins sains cueillis le même jour. Ces analyses comparatives ont été répétées tous les 10 jours.

Technique d'échantillonnage

Les prélèvements de raisins avaient lieu dans les régions productrices des grands vins blancs liquoreux, à Sauternes et à Barsac sur la rive gauche de la Garonne, et à Loupiac et Saint-Macaire sur la rive droite. De plus, en 1950, nous avons analysé des raisins provenant d'un vignoble de Graves, à Léognan, qui donne avec les mêmes cépages, des vins secs.

Dans les analyses de raisins, matériel toujours fortement hétérogène, la question de l'échantillonnage est un point particulièrement délicat. De la façon dont on effectue l'échantillon moyen, dépendent en effet, pour une grande part, les résultats de l'analyse et la valeur des conclusions qu'on peut en tirer. Tous les dix jours environ, toujours aux mêmes heures de la journée, plusieurs kilos de raisins étaient ramassés dans les vignobles d'expérience. On opérait toujours sur les mêmes rangées de ceps, en répartissant la cueillette sur environ 250 pieds. On prélevait par fragments de grappe, en choisissant autant que possible une partie

de raisins sains et une partie de raisins pourris. Au laboratoire, ces raisins étaient à nouveau triés grain par grain et séparés en deux lots : l'un de raisins mûrs, mais ne présentant pas d'attaque de *Botrytis*, l'autre de raisins pourris correspondant à ce qu'on appelle les grains « rôtis ». Nos échantillons ne représentaient donc pas l'état moyen actuel des raisins du vignoble. Nos analyses reflètent plutôt l'évolution de la composition des grains les plus pourris et les plus sains et expriment des différences dues à l'action du *Botrytis* par rapport à des raisins aussi avancés au point de vue maturité naturelle, mais non pourris.

Après ce triage, les grains des deux catégories sont comptés, pesés, écrasés et leur jus est exprimé modérément à l'aide d'une presse à main. Pour obtenir un meilleur épuisement, on lave les raisins avec un volume d'eau tiède correspondant à 10 p. 100 environ du jus exprimé. Dans les analyses on tient compte de la dilution qui est intervenue. On note les volumes de jus obtenus lors de la pressée de chaque lot.

Les moûts sont alors pasteurisés à 80° en bouteilles bouchées de liège et conservés en flacons bouchés jusqu'au moment des analyses. Celles-ci étaient terminées après 3 mois de conservation.

Résultats analytiques

Les documents analytiques obtenus font l'objet de 6 tableaux différents.

Le tableau VIII présente les bilans acidimétriques des moûts de la récolte de 1950. Nous y avons exprimé les bilans des transformations dues au *Botrytis*, en calculant les différences de composition des grains sains et pourris. Bien qu'en réalité, ces analyses ne s'appliquent pas exactement aux mêmes baies envisagées avant et après l'action de la pourriture, ces bilans des transformations sont valables et mettent en relief des différences intéressantes.

Dans le tableau IX, à partir des mêmes chiffres, on a calculé les teneurs en milliéquivalents pour 1000 grains de raisin. Ce tableau représente l'action du *Botrytis* sur les constituants chimiques du grain de raisin indépendamment des modifications de volume et de la perte d'eau.

Les tableaux X et XII donnent, respectivement pour les crus de la rive gauche et de la rive droite de la Garonne, l'évolution de la composition des raisins sains et pourris dans les semaines précédant la cueillette. Les résultats des analyses sont exprimés sous forme de bilans acidimétriques. On a dosé également les sucres et le glycérol. Précisons qu'à notre connaissance, il n'avait pas encore été publié de bilans acidimétriques ou des transformations de jus de raisins botrytisés.

Les tableaux XI et XIII expriment ces mêmes résultats calculés pour 1 000 grains de raisin et représentent le phénomène physiologique.

TABEAU VIII

Influence de la pourriture noble sur la composition du moût de la récolte 1950
Milliéquivalents par litre de moût

État des raisins	Sucre g	pH	Acidité	Alcalinité des cendres	NH ₄	Somme des cations	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide acétique	Acide phos- phorique	Somme des anions
Barsac												
Sains.....	238	3,35	80	33	4,8	118	69	30	3,6	4,0	4,7	111
Pourris.....	431	3,28	84	70	2,0	156	42	75	8,0	19,0	8,0	152
Variations.....			+	+	- 2,8	+	- 27	+	+	+	+	+
Sauternes												
Sains.....	248	3,65	55	25	2,3	82	47	25	2,9	3,6	4,2	83
Pourris.....	457	3,60	107	66	1,8	175	57	73	9,8	11,8	9,7	161
Variations.....			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Léognan												
Sains.....	222	3,20	84	28	3,1	115	80	34	3,9	2,0	2,5	122
Pourris.....	296	3,31	101	44	2,1	147	53	59	9,8	7,9	4,3	134
Variations.....			+	+	- 1,0	+	- 27	+	+	+	+	+

TABEAU IX

Influence du *Botrytis cinerea* sur la composition de la baie de raisin récolte 1950

Milliéquivalents pour 1 000 baies de raisins

Etat des raisins	Poids de 100 baies	Jus de 100 baies	Sucre	100 G/L	Acidité	Alcalinité des cendres	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide acétique	Acide phos- phorique
					<i>Barsac</i>						
Sains.....	75 g	58 cm ³	139 g	80	46	19	42	17	2,1	2,3	2,7
Pourris.....	66	28	124	67	24	20	14	21	2,4	5,6	2,3
					<i>Saulernes</i>						
Sains.....	209	127	316	85	70	31	60	32	3,7	4,3	5,4
Pourris.....	101	48	220	80	51	32	27	35	4,7	5,3	4,7
					<i>Leognan</i>						
Sains.....	163	108	240	102	91	30	87	37	4,3	2,2	2,7
Pourris.....	94	47	140	70	48	21	25	27	4,6	3,7	2,0

TABIEAU X
Influence de la pourriture noble sur la composition du moût; récolte 1951 (Rive gauche de la Garonne)
Milliéquivalents par litre de moût

Dates	État des raisins	Sucres g	pH	Acidité	Alcalinité des cendres	NH ₄	Somme des cations	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide gluco- nique	Acide acétique	Acide phospho- rique	Somme des anions	Glycérol mmol
BARSAC															
25/IX	Sains	161	3,12	140	32	6,0	178	70	89	2,8	—	2,3	3,3	168	14
5/X	Pourris	195	3,21	122	43	2,2	167	52	99	4,2	1,4	6,1	3,0	165	
	Sains	169	3,18	127	33	4,7	165	72	75	3,1	—	2,0	3,0	155	
15/X	Pourris	210	3,30	108	47	3,3	158	43	86	5,4	2,3	7,7	3,7	148	
	Sains	226	3,27	126	38	5,2	169	68	87	2,3	—	3,6	3,0	164	24
24/X	Pourris	284	3,40	116	59	1,3	176	45	114	3,5	4,7	7,0	6,0	180	
	Sains	247	3,33	123	33	4,7	161	71	81	2,7	—	3,5	3,9	162	
	Pourris	317	3,62	112	81	0,7	194	33	117	3,5	10,6	5,4	6,9	176	31
SAUTERNES															
25/IX	Sains	293	3,06	188	47	2,9	238	87	139	2,4	—	3,0	4,0	235	7
5/X	Pourris	250	3,22	169	69	0,8	240	59	154	2,7	3,0	8,7	4,9	232	
15/X	Sains	224	3,14	170	47	2,2	219	68	123	2,7	—	1,7	4,5	200	18
	Pourris	295	3,26	141	75	0	216	56	138	5,2	3,0	11,0	4,7	218	
24/X	Sains	296	3,21	115	39	1,8	156	69	74	2,4	—	1,5	3,6	150	28
	Pourris	284	3,39	100	65	0,6	166	39	100	4,5	6,5	3,7	3,7	157	
	Sains	281	3,39	109	44	1,4	154	69	73	3,0	—	2,0	3,5	150	22
	Pourris	326	3,51	108	100	0,2	208	25	111	5,0	5,9	4,7	4,5	156	

TABEAU XI

Influence du Botrytis cinerea sur la composition de la baie de raisin ; récolte 1951 (Rive gauche de la Garonne)

Milliéquivalents pour 1000 baies de raisin

Dates	État des raisins	Poids de 100 baies g	Jus de 100 baies cm ³	Sucres g	100 G L	Acidité	Alcalinité des cendres	NH ₄	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide gluco- nique	Acide acétique	Acide phospho- rique
BARSAC														
25/IX	Sains	176	132	185	101	161	36	6,9	81	102	3,3	—	2,3	3,3
	Pourris	132	81	158	92	103	35	1,8	42	80	3,4	1,1	6,1	3,0
5/X	Sains	184	120	203	99	142	38	5,6	86	90	3,4	—	2,4	3,6
	Pourris	145	81	170	88	88	38	2,7	35	70	4,4	1,9	6,2	3,0
15/X	Sains	191	105	237	95	132	40	5,5	71	92	2,4	—	3,8	3,5
	Pourris	132	57	162	83	66	34	0,7	26	65	2,0	2,7	4,0	2,7
24/X	Sains	202	100	247	92	123	33	4,7	71	81	2,7	—	3,5	3,9
	Pourris	98	45	159	83	50	37	0,3	15	54	1,6	4,8	2,4	3,0
SAUTERNES														
25/IX	Sains	215	115	233	107	216	54	3,4	100	160	2,7	—	3,5	4,4
	Pourris	124	81	165	93	137	56	0,5	48	125	2,4	2,4	5,7	3,3
5/X	Sains	260	120	319	105	206	56	2,6	94	148	3,8	—	2,3	7,1
	Pourris	146	81	241	90	114	62	0	45	112	4,1	2,4	9,0	3,8
15/X	Sains	280	155	319	98	178	60	2,8	107	115	3,7	—	2,3	5,5
	Pourris	140	80	227	80	80	52	0,5	31	80	3,6	5,2	3,0	3,0
24/X	Sains	285	145	367	96	158	64	2,0	100	105	4,3	—	2,9	5,1
	Pourris	112	62	203	75	67	62	0,1	15	69	3,1	3,7	2,8	2,8

TABEAU XII
Influence de la pourriture noble sur la composition du moût ; récolte 1951 (Rive droite de la Garonne)
Milliéquivalents par litre de moût

Dates	État des raisins	Sucres g	pH	Acidité	Alcalinité des cendres	NH ₄	Somme des cations	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide gluco- nique	Acide acétique	Acide phospho- rique	Somme des anions	Glycérol mmol
LOUPLAC															
25/IX	Sains	191	3,15	94	45	4,8	144	76	51	3,5	—	2,0	4,3	137	
	Pourris	248	3,46	81	87	0,5	169	60	86	6,1	2,2	12,0	5,2	171	24
5/X	Sains	220	3,16	104	47	2,0	153	84	53	3,2	—	2,3	3,5	146	
	Pourris	325	3,50	91	96	0,5	188	74	82	5,7	2,8	8,5	5,5	178	17
15/X	Sains	244	3,20	98	46	1,6	146	76	56	2,7	—	1,2	4,8	141	
	Pourris	282	3,53	78	78	0,2	156	64	63	5,0	4,7	8,3	5,0	150	23
24/X	Sains	242	3,37	78	44	1,5	124	76	41	2,7	—	1,5	4,7	126	
	Pourris	320	3,62	71	94	0	165	61	77	4,8	5,6	3,9	5,0	157	21
SAINT-MACAIRE															
25/IX	Sains	199	2,98	127	38	5,3	170	66	91	3,8	—	1,0	4,3	166	
	Pourris	240	3,03	162	57	3,0	222	74	130	5,1	2,1	3,6	5,1	220	12
5/X	Sains	222	3,15	134	43	4,4	181	77	86	2,5	—	3	5,5	174	
	Pourris	303	3,30	163	70	2,2	235	70	118	5,7	2,8	12	2,7	211	15
15/X	Sains	229	3,20	107	37	4,4	148	65	71	2,8	—	1,5	5,1	145	
	Pourris	282	3,32	109	62	1,8	173	54	95	4,2	6,8	5,3	4,0	169	19
24/X	Sains	228	3,31	105	37	4,0	146	63	67	3,1	—	2,0	5,0	140	
	Pourris	280	3,42	95	50	0,4	145	45	84	3,8	5,9	6,1	4,6	149	19

TABIEAU XIII

Influence du *Botrytis cinerea* sur la composition de la baie de raisin ; récolte 1951 (Rive droite de la Garonne)

Milliéquivalents pour 1000 baies de raisin

Dates	État des raisins	Poids de 100 baies g	Jus de 100 baies cm ³	Sucres g	100 G L	Acidité	Alcalinité des cendres	NH ₄	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide gluco- nique	Acide acétique	Acide phospho- rique
LOUPIAC														
25/IX	Sains	253	131	250	93	123	56	2,3	99	87	4,6	—	2,6	5,6
	Pourris	92	62	173	88	50	54	0,3	37	53	3,8	1,3	7,4	3,2
5/X	Sains	215	120	264	92	125	56	2,4	100	76	3,8	—	2,7	3,5
	Pourris	100	61	198	87	56	58	0,3	44	50	3,5	1,5	5,2	3,3
15/X	Sains	280	125	305	92	123	57	2,0	98	70	3,6	—	1,5	6,0
	Pourris	116	66	199	85	48	51	0,1	42	42	3,3	3,1	7,2	3,4
24/X	Sains	273	130	313	90	100	57	1,9	99	53	3,7	—	1,8	6,0
	Pourris	100	62	198	85	44	58	0	38	48	3,0	3,5	2,4	3,0
SAINT-MACAIRE														
25/IX	Sains	200	110	220	97	141	42	5,8	72	100	4,2	—	1,1	5,9
	Pourris	126	66	161	90	107	38	2,0	49	86	3,4	1,4	4,3	3,0
5/X	Sains	205	103	229	90	138	44	4,5	79	89	2,6	—	3,1	5,7
	Pourris	130	60	182	81	98	42	1,3	42	80	3,4	1,7	7,2	1,6
15/X	Sains	215	118	260	90	125	44	5,3	77	84	3,3	—	1,8	6,0
	Pourris	135	80	225	82	87	49	1,6	43	76	3,4	5,4	4,2	3,2
24/X	Sains	220	120	273	88	127	44	4,8	76	80	3,7	—	2,4	6,0
	Pourris	140	86	245	83	82	43	0,3	39	72	3,3	4,6	5,2	3,8

En somme, les résultats de chaque analyse ont été exprimés de deux façons différentes : 1^o par rapport à un certain nombre de grains de raisin ; on dégage ainsi l'effet physiologique du *Botrytis* sur les constituants chimiques du grain ; 2^o en valeurs rapportées au litre de moût ; ces chiffres représentent le résultat global du développement de la pourriture noble. La composition des moûts est conditionnée à la fois par l'action propre du *Botrytis* et par les actions physiques qui l'accompagnent, en particulier la concentration par évaporation d'eau. Dans notre exposé nous séparerons ces deux phénomènes qui seront étudiés successivement.

A. ACTION DU *Botrytis cinerea* SUR LES CONSTITUANTS DU GRAIN DE RAISIN

Dans les grandes lignes, ces transformations sont celles que nous avons observées lors des cultures pures sur moût de raisin, mais dans les détails apparaissent des différences importantes. Les conditions du développement du parasite in vitro et sur le grain de raisin ne sont pas absolument comparables. On notera que nos expériences durèrent plus d'un mois, alors qu'au vignoble l'action du *Botrytis* est rarement aussi prolongée. Par contre, pour le raisin la surface offerte au champignon est particulièrement importante en regard du volume du grain ; on peut calculer que pour un même volume de jus, le *Botrytis* occupe une surface 3 fois plus importante dans le cas du grain de raisin que dans le cas de nos cultures. Il faut considérer encore que le raisin est un milieu cellulaire, donc très hétérogène. Toutes les cellules ne sont certainement pas attaquées et toutes ne sont pas attaquées en même temps par le *Botrytis*. C'est vraisemblablement le contenu des vacuoles des cellules de la périphérie, qui est le plus modifié. Le *Botrytis* pénètre ses filaments dans le raisin en profondeur, mais la masse mycélienne reste faible et la végétation aérienne restreinte. Enfin, nous avons déjà souligné au début de ce chapitre, la discontinuité du développement du *Botrytis* dans la nature, due à l'alternance dans une même journée de conditions favorables et défavorables. On conçoit donc que les modifications observées au paragraphe précédent dans la composition des moûts ayant servi de culture ne peuvent être exactement reproduites dans une étude in vivo.

Nous étudierons successivement l'action du *Botrytis* sur les sucres et sur les acides du raisin, et la formation d'acide citrique, d'acide acétique, d'acide gluconique et de glycérol.

Action de la pourriture noble sur les sucres. — Les sucres ont été brûlés par le *Botrytis* d'une manière très importante. On trouve toujours nettement moins de sucres, en valeur absolue, dans les grains pourris que dans les grains sains. Au cours des quatre prélèvements effectués, le taux de sucre ne cesse d'augmenter de 10 jours en 10 jours dans les raisins sains.

La maturation en 1951 a été très tardive, mais l'accumulation du sucre dans le raisin s'est poursuivie jusqu'à la fin octobre.

Il n'en est pas ainsi pour les raisins pourris, pour lesquels la teneur en sucre passe par un maximum, généralement au début d'octobre, puis décroît au fur et à mesure que le *Botrytis* se développe.

Remarquons tout d'abord que la pourriture n'a pas évolué partout de la même façon. Très active surtout à Loupiac, puis à Sauternes et Barsac, elle est, dans le même temps, beaucoup plus faible et de développement plus lent à Saint-Macaire. Il est certain que la pourriture noble trouve dans certains microclimats des conditions plus favorables.

Dans le tableau XIV, nous avons rassemblé à côté du facteur de concentration calculé d'après la perte de poids du grain de raisin, les pourcentages de combustion des sucres et des différents acides. Il est bien entendu que ces valeurs ne représentent pas le phénomène moyen ayant influé sur la composition de la récolte, puisque les analyses ont porté sur les raisins triés les plus pourris, mais qu'elles représentent l'action limite du *Botrytis*. La proportion de sucre brûlé n'a cessé d'augmenter, du 25 septembre au 24 octobre. Dans les régions de pourriture noble typique, elle atteint 35 à 44 p. 100. Peut-être ; ces différences ne sont pas simplement le fait d'une combustion. Il n'est pas impossible que la migration des sucres soit interrompue beaucoup plus tôt vers les raisins mortifiés par le parasite. Quoi qu'il en soit, la pourriture noble occasionne une perte considérable de sucre de la récolte sur pied. En vendangeant des raisins sains, le producteur récolterait en supplément, sur la totalité de son vignoble, plus de la moitié du tonnage de sucres qu'apportent les raisins pourris rôtis, répartis sur un volume double de vin. Ce n'est donc qu'au prix de pertes importantes de quantité, que le producteur obtient, par la concentration naturelle, des vins plus riches et de plus grande qualité.

Dans tous les cas où il a été déterminé, le rapport glucose/lévulose a diminué durant le développement de la pourriture. Dans les raisins, comme cela avait été observé sur les moûts, le glucose est davantage attaqué que le lévulose.

Action de la pourriture noble sur les acides. — La pourriture s'est toujours traduite par une forte diminution de l'acidité du grain de raisin. Le tableau XIV exprime cette diminution dans la colonne « pourcentage de combustion de l'acidité ». On observe que ce pourcentage augmente continuellement durant la surmaturation. Parfois jusqu'aux deux tiers des acides du raisin disparaissent. Parallèlement le pH augmente de 0,1 à 0,2 par rapport à celui du jus de raisins sains.

Par ailleurs, on remarque que la combustion des acides est proportionnellement toujours beaucoup plus élevée que la combustion des sucres. Le *Botrytis* exerce une action vraiment élective sur les acides du raisin. La perte d'acidité représente parfois presque le double de la consommation

des sucres. C'est une relation qu'il convient de souligner, car il est très avantageux au point de vue de la qualité, que l'acidité du raisin soit abaissée plus que sa richesse en sucre.

D'après les résultats des tableaux XI et XIII, il est clair que les acides tartrique et malique sont tous deux brûlés par le *Botrytis*. Tandis que le taux d'acide tartrique des grains sains n'a pas varié dans le mois précédant les vendanges, il est très inférieur dans les raisins pourris, où il n'a pas cessé de décroître. A Sauternes, il y a 6 fois moins d'acide tartrique dans les raisins pourris que dans les raisins sains ; les rapports sont plus faibles à Loupiac et à Saint-Macaire.

Les pourcentages de combustion des acides tartrique et malique ont été du reste comparés dans le tableau XIV. La diminution de l'acide malique a toujours été 2 à 3 fois plus faible que celle de l'acide tartrique. Dans deux cas même en 1950, les raisins pourris avaient un peu plus d'acide malique que les raisins sains.

Ces résultats sont en opposition avec ceux que nous avaient donné les cultures sur moût où les deux acides étaient identiquement attaqués. Peut-être pourrait-on voir l'explication de ces différences de comportement dans le fait qu'acide malique et acide tartrique ne se trouvent pas répartis de la même façon dans le grain de raisin. En accord avec certaines observations, il semble que l'acide tartrique est plus abondant dans les cellules de la périphérie et qu'au contraire l'acide malique se trouve surtout dans l'intérieur du grain. L'acide tartrique serait ainsi plus accessible à l'action du *Botrytis* que l'acide malique.

Quoi qu'il en soit, et sans négliger cette diminution de l'acide malique, on peut dire que le résultat pratique de l'action du *Botrytis* par rapport au phénomène de la maturation normale se traduit par un abaissement de l'acidité du grain, en diminuant surtout l'acide tartrique.

Formation d'acides par la pourriture noble. — On n'a jamais constaté dans les raisins pourris, une augmentation de la teneur en acide citrique. Les variations qu'indiquent les tableaux IX, XI et XIII, et qui vont aussi bien dans un sens que dans l'autre, sont faibles et restent de l'ordre des erreurs des mesures. Ces résultats ne confirment pas exactement ceux obtenus dans les cultures pures. Il faut donc penser, ou bien que les variétés de *Botrytis cinerea* qui se sont développées dans les différents vignobles étudiés, ont des pouvoirs citrogènes nuls, ou bien encore que les conditions de développement in vivo ne reproduisent pas celles qui sont nécessaires à l'apparition de l'acide citrique.

De même, la divergence est nette en ce qui concerne l'acide acétique. Nous n'avions observé dans les cultures du *Botrytis* que de très faibles formations de cet acide, mais dans les raisins pourris elles sont beaucoup plus importantes. Elles correspondent, à cause également de la concentration que nous étudierons plus loin, à des teneurs en acidité volatile qui ne

sont jamais négligeables et qui peuvent atteindre exceptionnellement 19 méq par litre. Certaines années il arrive que ces chiffres soient dépassés.

TABLEAU XIV
Transformation du grain de raisin par la pourriture noble

Dates des prélèvements	Coefficient de concentration	Pourcentages de combustion			
		des sucres	de l'acidité	de l'acide tartrique	de l'acide malique
		<i>Barsac 1950</i>			
	1,14	11	48	66	—
		<i>Sauternes 1950</i>			
	2,06	30	27	55	—
		<i>Leognan 1950</i>			
	1,72	42	47	71	27
		<i>Barsac 1951</i>			
25/IX	1,32	9	36	48	22
5/X	1,26	16	38	59	22
15/X	1,45	32	50	63	29
24/X	2,06	35	59	79	33
		<i>Sauternes 1951</i>			
25/IX	1,72	29	36	52	22
5/X	1,78	25	44	52	24
15/X	2,00	29	55	71	30
24/X	2,55	44	58	85	34
		<i>Loupiac 1951</i>			
25/IX	2,75	30	59	52	39
5/X	2,15	25	55	56	34
15/X	2,42	35	61	56	40
24/X	2,73	37	66	61	10
		<i>Saint-Macaire 1951</i>			
25/IX	1,60	27	24	32	14
5/X	1,58	21	29	47	10
15/X	1,60	14	30	44	10
24/X	1,58	10	35	49	10

On a retrouvé dans tous les raisins pourris la présence d'acide gluconique, alors que les raisins sains n'en contiennent que des traces correspondant à la limite de sensibilité de la méthode de dosage. Les teneurs en acide gluconique augmentent progressivement de 10 jours en 10 jours et il s'en forme jusqu'à 5 méq pour 1 000 grains de raisin. Ramenées au litre de moût, les teneurs varient de 5,6 à 10 méq, soit grossièrement de 1 à 2 g. La présence d'acide gluconique dans un moût, et dans un vin de cet acide infermentescible, est une preuve de l'intervention de la pourriture, et les taux d'acide gluconique sont d'autant plus élevés que l'attaque des raisins par le *Botrytis* a été plus poussée.

Formation de glycérol par la pourriture noble. — Dans tous les raisins pourris, on relève la formation du glycérol (tableaux X et XII). Les

teneurs augmentent, avec quelques irrégularités, durant la surmaturation. Au moment de la dernière trie, à la fin octobre, on trouve de 20 à 30 mmol de glycérol par litre de moût, soit environ 2 à 3 g. Ces proportions sont nettement plus faibles que celles des documents de LABORDE. Mais l'automne 1951 n'a pas été particulièrement favorable à la maturation du raisin et au développement de la pourriture noble. Les richesses en sucre n'ont pas dépassé 18°Baumé et les teneurs en glycérol indiquées ici doivent vraisemblablement être dépassées dans des moûts plus riches d'une année de grande maturation.

B. PHÉNOMÈNE PHYSIQUE DE CONCENTRATION PAR ÉVAPORATION D'EAU

L'attaque du grain de raisin par le *Botrytis* ne se borne pas aux importantes transformations physiologiques qui viennent d'être étudiées. Le raisin attaqué est devenu un organe mort. La pellicule est percée par les filaments mycéliens, les parois cellulaires sont dissoutes par la pectase et la cytase du champignon parasite. L'organisation du grain de raisin est rompue et la migration et les échanges avec la plante sont stoppés. Le tissu végétal, ainsi désorganisé, est dès lors soumis aux influences extérieures. En période sèche et chaude, il perd rapidement de l'eau et se concentre ; la richesse en sucre de son moût s'accroît considérablement. En période pluvieuse ou humide, au contraire, il absorbe de l'eau comme une éponge et le degré diminue rapidement. Les fluctuations journalières de la teneur en sucres du jus d'expression des raisins sont, de ce fait, très importantes. L'humidité des brouillards matinaux, fréquents à cette époque de l'année dans la vallée de la Garonne, suffit à abaisser les degrés. Les vendanges doivent se poursuivre par beau temps. Au cours d'une journée ensoleillée, on voit les degrés augmenter parfois de plusieurs unités et les « charges » de raisins de l'après-midi donnent les moûts les plus riches.

Nous avons exprimé dans le tableau XIV, le coefficient de concentration calculé d'après la perte de poids du grain de raisin. C'est le rapport du poids de 100 grains pourris à celui de 100 grains sains. D'après les considérations précédentes, ce coefficient est donc très variable ; pour les mêmes conditions de cueillette, il a varié de 1,58 à 2,73. Généralement il ne cesse d'augmenter avec la surmaturation et c'est ce qu'on observe à Barsac et à Sauternes. Mais il s'est maintenu à Loupiac et à Saint-Macaire, où la concentration maximum était déjà acquise le 25 septembre. Ce coefficient est assez bien en relation avec la richesse saccharine des moûts, que donnent les tableaux VIII, X, et XII.

Les acides sont de même concentrés, comme tous les constituants du moût, et si finalement l'acidité du raisin n'augmente pas en rapport avec les sucres, on le doit au fait que les acides sont proportionnellement plus brûlés par le *Botrytis* que les sucres. Généralement l'acidité du moût

de raisins pourris est un peu plus faible que celle du moût sain, mais les tableaux donnent de nombreux exemples pour lesquels ces deux acidités sont du même ordre ou même pour lesquels l'acidité du moût pourri est la plus forte. Ces modifications dépendent de beaucoup de facteurs. Si le *Botrytis* intervient sur des raisins très mûrs, déjà peu acides, qui seront par la suite fortement concentrés dans une période de temps favorable, le moût final pourra être plus acide que celui qui aurait été obtenu avec des raisins non pourris. Au contraire, une pourriture précoce de raisins encore insuffisamment mûrs, donc acides, comme ce fut le cas en 1951, peut se traduire par une forte diminution de l'acidité du moût, diminution qui prend le pas sur la concentration.

Même quand le moût pourri a une acidité de titration plus forte, son pH est plus élevé que celui du moût sain. C'est en effet l'acide tartrique, qui conditionne pour une grande part la concentration en ions H^+ , parce qu'il est l'acide organique le plus fort du vin, qui est le plus attaqué par la pourriture.

En somme, ce qui différencie au point de vue acidimétrique le moût de raisins pourris du moût de raisins sains, c'est que le premier contient proportionnellement davantage d'acides faibles que le second et que le taux de salification de ces acides est beaucoup plus élevé. Le nouvel équilibre physico-chimique qui en résulte contribue certainement à donner pour une large part, leurs caractères spéciaux aux vins vinifiés avec le concours de la pourriture noble.

IV. — Composition des grands vins liquoreux

En conclusion de ce chapitre, nous donnons des exemples de la composition analytique détaillée de vins liquoreux obtenus avec le concours de la pourriture noble du raisin. Le tableau XV rassemble des données pour des vins de qualité exceptionnelle. Les analyses des vins de Barsac ont été effectuées sur les lots récoltés successivement dans un même vignoble, au fur et à mesure des tries. D'un lot à un autre ; les différences de composition peuvent être considérables. On observe en 1949 ; au cours d'une période de temps très favorable, l'évolution progressive de la pourriture noble qui se traduit par une augmentation constante de la richesse du vin en alcool, en sucre et aussi en acidité, des premières aux dernières tries. En 1950 l'évolution est plus irrégulière. Les analyses des vins de Sauternes du bas du tableau correspondent à l'ensemble des récoltes de différents millésimes d'un même cru.

Tous ces vins se caractérisent par leur grande richesse de composition et on peut dire que ce sont de véritables vins concentrés. Leur composition est marquée davantage par le phénomène physique de concentration du raisin que par l'action physiologique propre du *Botrytis cinerea*. Leur

TABEAU XV
Composition acidimétrique de vins blancs liquoreux

	Alcool	Degré Baumé	Richesse totale	Glycérol mmol	pH	Acidité de titration	Alcalinité des cendres	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide gluconique	Acide acétique	Acide lactique	Acide succinique	Acide phosphorique
CHATEAU D., BARSAC 1949															
1	15 ⁰²	0 ⁰⁴	15 ⁰⁶	160	3,62	85	24	17,5	35	7,4	—	12,2	10,7	18,6	5,2
2	14 ⁰⁸	0 ⁰³	15 ⁰¹	127	3,59	76	32	19,8	43	4,5	—	9,2	8,0	14,3	3,2
3	16 ⁰⁶	0 ⁰³	16 ⁰⁹	142	3,55	81	34	16,4	39	8,8	—	14,7	10,0	15,8	3,4
4	11 ⁰⁰	9 ⁰⁶	20 ⁰⁶	155	3,00	95	61	23,8	62	12,0	—	23,2	5,0	15,2	4,0
5	11 ⁰⁸	8 ⁰⁶	20 ⁰⁴	145	3,58	102	35	19,8	46	9,9	—	19,0	8,0	17,8	5,0
6	12 ⁰²	8 ⁰¹	20 ⁰³	139	3,59	109	40	22,1	60	11,4	—	27,0	3,6	19,6	5,5
CHATEAU C., BARSAC 1950															
1	15 ⁰¹	2 ⁰²	17 ⁰³	157	3,72	94	33	11,4	46	10,7	3,0	16,2	9,0	—	4,3
2	13 ⁰²	2 ⁰⁰	15 ⁰²	129	3,52	81	30	16,2	35	7,6	3,0	13,7	8,0	—	3,5
3	14 ⁰²	7 ⁰²	21 ⁰⁴	148	3,76	76	41	11,0	36	8,9	3,4	25,2	9,0	—	4,0
4	14 ⁰⁶	2 ⁰⁴	17 ⁰⁰	145	3,54	79	36	19,3	42	9,3	4,6	15,4	10,0	—	3,2
5	14 ⁰⁰	6 ⁰⁴	20 ⁰⁴	153	3,80	83	44	18,4	48	9,1	1,3	22,2	10,0	—	4,3
6	13 ⁰²	5 ⁰⁷	18 ⁰⁹	120	3,35	72	28	15,4	37	7,3	1,0	14,0	6,0	—	3,8
CHATEAU X., SAUTERNES															
1947	15 ⁰³	7 ⁰⁶	22 ⁰⁹	184	3,51	94	35	10,3	45	14,4	3,3	25,3	4,0	—	7,0
1948	15 ⁰⁴	6 ⁰³	21 ⁰⁷	124	3,33	87	16	16,3	25	12,9	2,5	20,6	5,0	—	7,2
1949	15 ⁰⁰	6 ⁰⁶	21 ⁰⁶	166	3,77	77	35	17,2	31	6,9	3,2	24,4	4,5	—	6,0
1950	14 ⁰⁷	7 ⁰⁰	21 ⁰⁷	150	3,85	85	39	23,6	39	8,6	4,5	26,2	4,5	—	7,0

Sauf indication spéciale les chiffres sont des milliéquivalents.

richesse totale atteint 15° à 22°9 ; ils présentent jusqu'à 150 g de sucre non fermenté. La plupart des constituants du vin s'y trouvent à doses plus fortes que dans les vins normaux.

Les teneurs en glycérol sont particulièrement élevées, grâce à la production par le *Botrytis*, grâce aussi vraisemblablement à la formation plus importante de glycérol par les levures dans un milieu aussi riche en sucre. Dans les exemples donnés, les teneurs varient de 11 g à 17 g par litre. C'est là une des principales caractéristiques de ces vins.

Du point de vue acidimétrique, ils présentent des acidités de titration relativement élevées qui peuvent atteindre 5,0 g par litre en acide sulfurique. Cependant leur acidité réelle reste faible et leur pH dépasse le plus souvent 3,5. C'est l'acide malique qui est l'acide principal de ces vins ; il varie ici de 1,7 g à 4 g par litre. L'acide tartrique peut tomber au-dessous de 1 g. L'acide lactique est également très faible et ne dépasse pas les quantités qui sont habituellement formées au cours de la fermentation alcoolique pure. Dans ces conditions de vinification, il n'y a donc jamais intervention de bactéries mololactiques et, du reste, des essais directs en vue de provoquer cette fermentation dans des vins liquoreux, avant sulfitage, ont toujours échoué.

En dehors de toute cause d'altération et par le jeu normal de l'action du *Botrytis* et de la concentration, l'acide acétique peut atteindre des taux assez élevés ; des acidités volatiles de l'ordre du gramme par litre sont courantes. Enfin, l'acide citrique, fort variable d'un vin à un autre, arrive parfois presque à 1 g par litre ; pour plus de la moitié des vins analysés, il dépasse 0,5 g. Comme nous l'avons établi dans l'étude de la surmaturation du raisin les doses élevées de cet acide ne proviennent pas d'une formation par le *Botrytis*, mais du seul phénomène de concentration.

Enfin dans tous les vins provenant de raisins pourris, on note la présence d'un acide qui avait échappé jusqu'à maintenant aux analyses : l'acide gluconique. Cet acide qui ne se trouve pas dans les vins issus de raisins sains, permet d'établir une discrimination précise entre ceux-ci et ceux provenant de vendange botrytisée (31). Sa teneur représente même, dans une certaine mesure, l'importance de l'attaque du raisin par le champignon.

L'acide gluconique du moût, n'étant pas transformé par la fermentation, se retrouve intégralement dans le vin. Nous avons rassemblé dans le tableau XVI quelques résultats de nos analyses sur les vins blancs de la Gironde. Les vins blancs de la région des Graves, qui proviennent presque toujours de raisins cueillis après un début de pourriture, même pour la production de vins secs ou peu sucrés, présentent de 1,5 à 3,2 méq, soit de 0,29 à 0,82 g par litre. Les vins moelleux et liquoreux des Premières Côtes et de Sainte-Croix-du-Mont ont de 2,6 à 5,2 méq (0,51 g à 1,02 g). Les régions à pourriture noble caractérisée donnent les vins les plus riches

en acide gluconique. A Sauternes et Barsac, les teneurs de cet acide vont de 3,0 à 12,6 mēq, soit du demi-gramme à 2 g et demi.

TABLEAU XVI

Acide gluconique dans les vins blancs de la Gironde

Origine des vins	Degrés	Densité Baumé	Richesse totale	Acide gluconique en mēq
<i>Vins blancs secs de Graves:</i>				
Léognan 1952	12°5			1,5
Cabanac 1952	12°4			2,1
Castres 1952	12°4			2,1
Cérons 1951	13°6			2,4
Portets 1951	14°0			4,2
<i>Vins blancs de la rive droite de la Garonne:</i>				
Quinsac 1952	11°2	1°2	12°4	2,6
Camblanes 1952	11°5	0	11°5	2,6
Sainte-Croix-du-Mont 1950	12°8	3°0	15°8	2,9
Langoiran 1951	15°1	4°0	19°1	3,2
Cénac 1950	12°5	1°9	14°4	3,6
Sainte-Croix-du-Mont 1950	13°4	3°3	16°7	3,6
Sainte-Croix-du-Mont 1949	13°1	3°5	16°6	4,2
Cadillac 1950	15°2	4°2	19°4	5,2
<i>Vins blancs de Sauternes et de Barsac:</i>				
R 1949	13°3	5°9	19°2	3,9
R 1950	13°4	5°0	18°4	3,3
R 1951	13°7	3°4	17°1	3,0
DV 1949	13°0	9°5	22°5	5,7
DV 1950	15°0	4°5	19°5	6,2
DV 1951	16°0	0°5	16°5	7,6
M 1949	14°8	3°9	18°7	12,6
M 1950	14°6	4°7	19°3	10,4
C 1949	14°5	4°8	19°3	4,6
C 1950	14°0	6°3	20°3	4,6
C 1951	13°9	1°3	15°2	5,5
RS 1951	13°5	3°5	17°0	2,5
Ca 1949	13°3	3°7	17°0	5,5
Ca 1950	13°6	3°1	16°7	5,3

Il semble y avoir une relation grossière entre la quantité d'acide gluconique et la richesse totale du vin, mais cet acide semble être aussi une caractéristique du cru. On peut remarquer pour un même cru le peu de variation qui existe dans les teneurs en acide gluconique d'une récolte à une autre, pourtant de qualités fort différentes.

On possède donc dans le dosage de l'acide gluconique, un moyen de confirmer l'authenticité des vins liquoreux obtenus grâce au concours de la pourriture noble. D'autre part il y a lieu de réserver à cet acide, qui n'y avait jamais été signalé, une place dans la composition des vins.

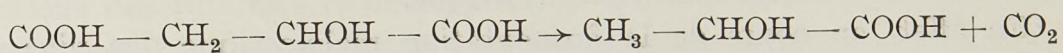
C'est presque un lieu commun de dire que la composition du vin est finalement le reflet des différents phénomènes physiologiques qui se sont succédés pour sa préparation. Chaque microorganisme qui intervient

(levures bactéries), concourt à donner au vin sa personnalité, chaque condition de fermentation influe sur la composition finale du produit. De même les vins liquoreux de la Gironde doivent leur composition particulière et leur qualité si exceptionnelle à la fois à l'action physiologique du *Botrytis* et à la concentration qui est aussi une des conséquences de l'action du *Botrytis* sur le raisin.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES FERMENTATIONS DES ACIDES MALIQUE ET CITRIQUE PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES

On appelle fermentation malolactique ou désacidification biologique des vins, ou parfois fermentation secondaire, une transformation biologique par des bactéries, conduisant en général à une amélioration des qualités organoleptiques du produit. Le phénomène essentiel de cette transformation est une diminution de l'acidité par fermentation de l'acide malique : cet acide qui est diacide est transformé en acide lactique monoacide suivant la réaction :



Nous étudions dans ce chapitre d'une part le mécanisme de cette fermentation, d'autre part ses circonstances et ses conséquences particulièrement dans le cas des vins blancs issus de vendanges saines ou de vendanges botrytisées.

KOCH a le premier montré que les bactéries sont capables de détruire l'acide malique du vin. SEIFERT (1) a le premier isolé l'agent ou plutôt un agent de cette transformation et montré qu'il forme aux dépens de l'acide malique, de l'acide lactique suivant la réaction précédente ; c'est un diplocoque qu'il a nommé *Micrococcus malolacticus*. Par la suite divers types de bactéries capables de réaliser cette transformation ont été isolées, telle *Bacterium gracile*. SEIFERT a en outre montré que l'acide lactique formé est de l'acide inactif ; ce fait a été confirmé par DUTOIT et DUBOIX.

Par la suite de très nombreux chercheurs, œnologues et biochimistes, se sont intéressés au problème de la fermentation malolactique : MÜLLER-THURGAU et OSTERWALDER (2), LÜTHI et RENTSCHLER (3) en Suisse, RIPPEL (4) et SCHANDERL (5) en Allemagne, GARINO-CANINA en Italie (6). En France, ce sont MOREAU et VINET (7), FERRÉ (8), RIBÉREAU-GAYON (9 et 10) et PEYNAUD (11) qui ont étudié cette fermentation. La plupart des auteurs cités considèrent que cette transformation est généralement bienfaisante et souvent même nécessaire. Ce point de vue a cependant été contesté par les spécialistes des vins de consommation courante. On doit à M. RIBÉREAU-GAYON cette notion importante qu'il n'existerait pas de

grands vins rouges de Bordeaux sans cette transformation : elle conduit en effet à un assouplissement du vin et à un affinement, à une modification importante de la couleur et du bouquet ; elle est le premier acte et certainement l'essentiel du vieillissement.

Mais la fermentation malolactique, son processus et ses conséquences n'ont pas été étudiés jusqu'à maintenant dans le cas qui nous a toujours particulièrement intéressé dans notre travail, des vins blancs du Bordelais issus de vendanges plus ou moins botrytisées et sulfitées, conditions très particulières qui ont une évidente répercussion sur les transformations microbiologiques du vin. Il était certain que cette fermentation se présenterait dans ces vins avec des aspects particuliers qu'il nous a paru intéressant d'étudier.

D'autre part on ne connaît pas le mécanisme intime de la fermentation malolactique et aucune hypothèse n'a été faite à son sujet. Selon RIPPEL (4) la réaction écrite précédemment serait impossible parce que endothermique. Selon certains il ne se forme pas seulement de l'acide lactique et du gaz carbonique ; il apparaîtrait une faible quantité d'acide acétique qui, selon RENTSCHLER, pourrait atteindre 10 p. 100. Nous avons abordé ce problème du mécanisme, dans le cas où la molécule décomposée est non l'acide malique, mais l'acide citrique.

En effet, au cours de la fermentation malolactique des vins, on constate que l'acide citrique disparaît également et plus ou moins complètement. Aussitôt après la fermentation alcoolique les vins contiennent toujours de petites quantités d'acide citrique de 3 à 6 méq par litre, provenant surtout du raisin et, pour une faible part, de la fermentation alcoolique elle-même ; mais les vins vieux ne renferment plus d'acide citrique, du moins les vins conservés sans dose notable d'acide sulfureux.

Cette décomposition bactérienne de l'acide citrique a été observée depuis longtemps. MÜLLER-THURGAU et OSTERWALDER (*loc. cit.*) ont montré que dans un milieu au bouillon de levure, il se forme à partir de l'acide citrique, surtout de l'acide acétique et un peu d'acide lactique. Cette production importante d'acide acétique, augmentant l'acidité volatile des vins, a été confirmée par la suite par divers auteurs.

On sait d'autre part que l'acide citrique du lait conduit par fermentation lactique à la formation de produits acétoïniques, notamment au diacétyl qui joue un rôle important dans l'arôme des beurres (12). Cependant DEFFNER (13) qui a étudié en 1938 le mécanisme de la fermentation de l'acide citrique en milieu neutre par les bactéries isolées de la levure de bière, n'envisage pas, dans son mémoire, la formation de corps acétoïniques.

Nous avons pu apporter des faits et des interprétations nouvelles sur la nature des produits secondaires formés et les mécanismes chimiques de ces transformations bactériennes. Nous avons surtout porté notre

attention sur la fermentation de l'acide citrique, mais ces notions seront en partie applicables à la fermentation de l'acide malique. Nous exposons d'abord ces questions d'ordre théorique avant de donner nos observations d'ordre technique concernant les conditions de la fermentation malolactique.

I. — Etude théorique

Transformation de l'acide citrique par les bactéries lactiques

Nous nous sommes proposés de rechercher les proportions des différents produits de la fermentation de l'acide citrique par les bactéries malolactiques travaillant dans les conditions des vins, c'est-à-dire à des pH assez bas et le mécanisme de cette fermentation.

DEFFNER a trouvé que dans cette fermentation une molécule d'acide citrique donne 1,3 à 1,8 molécule d'acide acétique ; 0,1 à 0,33 molécule d'acide formique ; 0,11 à 0,22 molécule d'acide succinique, 2 molécules de gaz carbonique et des traces d'alcool et d'éthanol. L'acide oxalacétique, étudié dans les mêmes conditions par cet auteur, donne les mêmes proportions des produits de décomposition que l'acide citrique, sauf pour l'acide acétique : une molécule d'acide oxalacétique donne 0,3 à 0,8 molécule seulement d'acide acétique, soit à peu près une molécule de moins que l'acide citrique. Ces résultats permettent à cet auteur de penser qu'au cours de la fermentation lactique, la molécule d'acide citrique est d'abord scindée en acide oxalacétique et en acide acétique.

A partir du dépôt d'un vin qui venait de subir une fermentation malolactique typique, nous avons isolé et purifié dans un vin à pH 3,4 riche en acide malique et additionné de gélose, une bactérie présentant les caractères morphologiques et physiologiques de *B. gracile* : elle ne décompose ni l'acide tartrique, ni le glycérol quel que soit le pH ; elle décompose les sucres aux pH élevés.

La décomposition de l'acide citrique par cette bactérie a été ensuite étudiée d'une part en milieu simple à base d'eau de levure, d'autre part dans un vin. Les cultures étaient effectuées dans des flacons obturés avec des bouchons de liège stérilisés, et conservés quelques semaines à 25°. Les résultats sont exprimés dans les tableaux XVII et XVIII. La première colonne de chaque tableau est relative au liquide témoin ensemencé sans addition d'acide citrique ; elle indique les produits formés par la décomposition d'autres produits que l'acide citrique et qu'il y aura lieu de déduire des nombres des colonnes suivantes.

Le 2,3 butanediol ($\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CH}_3$), l'acétylméthylcarbinol ou acétoïne ($\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CO} - \text{CH}_3$) et le diacétyle ($\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{CO} - \text{CH}_3$) ont été dosés par la réaction de LEMOIGNE,

TABLEAU XVII

Fermentation de l'acide citrique en milieu simple

(Les acides sont en milliéquivalents par litre, les corps acétoïniques en millimolécules par litre)

	Sans acide citrique	+ 120 méq d'acide citrique			
	pH 4,02	pH 3,32	pH 3,70	pH 4,02	pH 4,11
<i>Variation de l'acidité de titration....</i>		— 58	— 60	— 60	— 53
Acide acétique.....	+ 3,1	+ 56,2	+ 51,6	+ 54,1	+ 52
Acide lactique.....	+ 8,1	+ 8,5	+ 8,3	+ 7,9	+ 10
Acide citrique.....	0	— 119,7	— 119,6	— 120	— 119,6
<i>Somme des variations.....</i>		— 55	— 59,7	— 58	— 57,6
<i>Corps acétoïniques :</i>					
2,3 butanediol.....	0	4,3	2,4	5,1	2,8
Acétoïne.....	0	5,5	11,1	5,3	6,5
Diacétyle.....	0	0,2	0,03	0	0,08
<i>Somme.....</i>	0	10,0	13,5	10,4	9,4

TABLEAU XVIII

Fermentation de l'acide citrique dans un vin

(Les acides sont en milliéquivalents par litre, les produits acétoïniques en millimolécules par litre)

	Sans acide citrique	+ 30 méq d'acide citrique
		pH 3,62
pH après fermentation.....		3,80
Acide de titration avant fermentation.....	83	88
Acide de titration après fermentation.....	81	70
<i>Variation.....</i>	— 2	— 18
Acide acétique.....	0	+ 14,9
Acide lactique.....	+ 2	+ 2,6
Acide citrique.....	0	— 31,6
Acide malique.....	— 4	— 4,0
<i>Somme des variations.....</i>	— 2	— 18,1
<i>Corps acétoïniques :</i>		
2,3 butanediol.....	9,2	12,0
Acétoïne.....	0,4	0,2
Diacétyl.....	0,01	0,1
<i>Somme.....</i>	9,6	12,2

selon les techniques très précises d'HOOREMAN (14), après avoir chassé l'alcool, selon le mode opératoire décrit par PEYNAUD et M^{lle} LAFON (15).

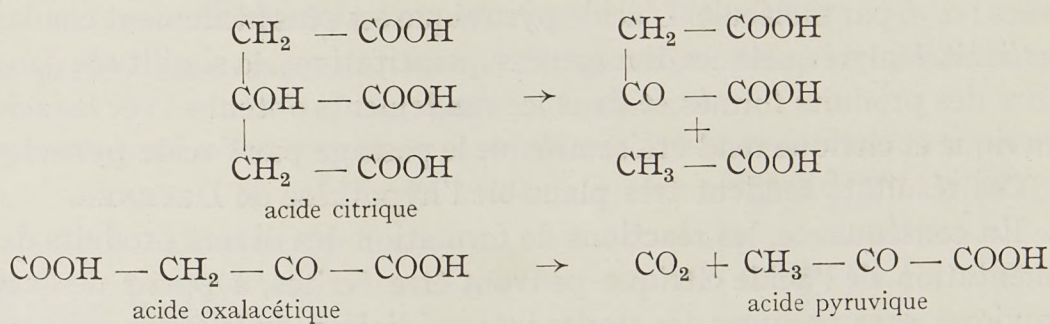
Il résulte de ces chiffres que la décomposition de l'acide citrique n'a pas fourni d'acide lactique (parfois une très faible quantité), mais, avec beaucoup de CO₂, beaucoup d'acide acétique (1,25 à 1,5 molécules pour 1 molécule d'acide citrique), et une forte proportion de corps acétoïniques. Leur somme est à peu près constante ; elle varie de 0,25 à 0,32 molécule par molécule d'acide citrique.

Cependant la nature de ces corps varie avec le milieu : alors que sur bouillon de levure il se forme généralement davantage d'acétoïne que de butanediol, dans le vin il se forme uniquement du butanediol et même l'acétoïne déjà présente diminue sensiblement. Dans l'eau de levure, il se forme des quantités notables de diacétyl ; dans le vin, la teneur en diacétyl n'est pas modifiée. Ces différences de comportement sont vraisemblablement liées à la nature différente des systèmes d'oxydoréduction qui existent entre les deux milieux. La diminution de l'acétoïne des vins, au cours de l'attaque de leurs constituants par des bactéries lactiques de maladie, avait déjà été observée (16).

Cette formation du butanediol dans les vins par les bactéries agissant sur l'acide citrique est un fait nouveau pour l'œnologie. Dans un vin renfermant à l'origine 5 méq d'acide citrique il pourra se former par cette voie 45 mg de butanediol, dose assez faible il est vrai ; elle pourrait atteindre 100 mg dans un vin additionné d'acide citrique.

Réactions intermédiaires de la dégradation de l'acide citrique

Les travaux antérieurs suggèrent le passage par l'acide oxalacétique et l'acide pyruvique selon les réactions :



En effet la première réaction est admise par DEFFNER. HIRSCH (17) admet que le précurseur des corps acétoïniques est l'acide pyruvique, PIEN (12) l'admet également dans le cas des bactéries de la crème du lait ; HOOREMAN (14) a récemment montré le fait pour *B. subtilis*. NEUBERG et GORR (18) ont montré la formation d'acétoïne à partir de l'acide oxalacétique. D'ailleurs la décarboxylation enzymatique de l'acide oxalacétique

est connue par les travaux de KRAMPITZ et WERKMANN (19) et WIELAND et Collaborateurs (20).

Il convenait donc d'étudier le comportement des bactéries malolactiques directement vis-à-vis de l'acide pyruvique (21). Les essais furent faits sur le milieu à l'eau de levure contenant 40 méq d'acide pyruvique par litre, tamponné par le bitartrate à pH 4,02. On a laissé un mois à l'étuve à 25°. Tout l'acide pyruvique avait disparu à ce moment ; bien entendu, l'acide tartrique restait intact. Un exemple de nos résultats est reproduit sous forme de bilan de transformation des acides dans le tableau XIX.

TABLEAU XIX

Fermentation de l'acide pyruvique en milieu simple

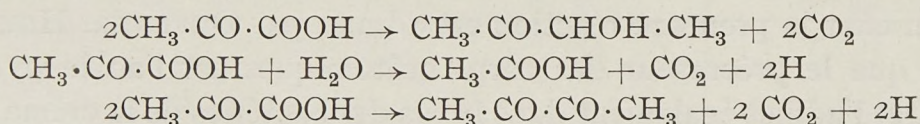
(Les acides sont en milliéquivalents par litre, les produits acétoïniques en millimolécules par litre)

pH après fermentation	4,65
Variation de l'acidité de titration	— 27
Acide acétique	+ 6,3
Acide lactique	+ 3,7
Acide pyruvique	— 40
Somme algébrique des variations	— 30
<i>Corps acétoïniques :</i>	
2,3 butanediol	11,2
Acétoïne	17,9
Diacétyl	0
Somme	29,1

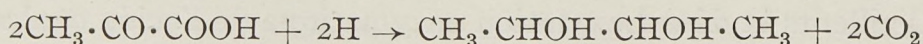
Ainsi une molécule d'acide pyruvique donne 0,16 molécule d'acide acétique, soit assez bien une molécule de moins que la molécule citrique. (L'acide lactique provient des éléments de l'eau de levure.) Par contre, les corps acétoïniques se retrouvent à des concentrations un peu plus élevées : 0,36 par molécule. L'acide pyruvique est plus facilement condensé que réduit. Malgré quelques divergences quantitatives, la similitude dans la nature des produits formés et dans les rendements obtenus avec les acides pyruvique et citrique rend vraisemblable le passage par l'acide pyruvique.

Ces résultats rendent très plausible l'hypothèse de DEFFNER.

En conséquence, les réactions de formation des divers produits de la fermentation de l'acide citrique peuvent être écrites, à partir de l'acide pyruvique, sans préjuger des stades intermédiaires, de la façon suivante :



En réalité, il n'y a pas de dégagement d'hydrogène et ces deux réactions sont couplées avec la suivante.



Toutes ces réactions peuvent d'ailleurs être aussi bien écrites à partir de l'acide oxalacétique ou même à partir de l'éthanal si l'on admet que, dans les réactions donnant lieu à un dégagement de gaz carbonique, les condensations font suite aux décarboxylations au lieu de les précéder. Ceci ne changerait rien aux bilans dont nous allons parler.

Dans une fermentation de l'acide citrique, la somme des produits formés, chacun d'eux étant affecté d'un coefficient tiré de la formule supposée de sa formation, doit être égale à l'acide citrique fermenté.

Désignons par c le nombre de milliéquivalents d'acide citrique disparu par litre, par e le nombre de milliéquivalents d'acide acétique apparu, par a et b le nombre de millimolécules d'acétoïne et de 2,3 butanediol apparu. On négligera pour simplifier le diacétyle, ainsi que les petites quantités d'acide lactique qui ont pu apparaître dans le vin. D'autre part rappelons qu'une fraction de l'acide acétique formé (soit $\frac{c}{3}$) provient de la première scission de l'acide citrique, si bien que seulement $e - \frac{c}{3}$ provient de l'acide oxalacétique ou ce qui revient au même de l'acide pyruvique.

Dans ces conditions il résulte des équations écrites précédemment que $(e - \frac{c}{3})$ méq d'acide acétique proviennent de 2 méq d'acide citrique et que a (ou b) millimolécules d'acétoïne (ou de butanediol) proviennent de $4a$ (ou $4b$) milliéquivalents d'acide citrique, si bien que l'on doit avoir :

$$c = \frac{c}{3} + 2\left(e - \frac{c}{3}\right) + 4a + 4b$$

Le tableau XX relatif aux déterminations précédentes montre que la relation se vérifie bien dans le cas des vins, moins bien dans le cas de l'eau de levure, comme s'il s'y formait d'autres corps.

TABLEAU XX

Bilan de la fermentation de l'acide citrique

(Les acides sont exprimés en milliéquivalents, les corps acétoïniques en millimolécules)

	Eau de levure à pH 4,02	Vin à pH 3,62
Acide citrique disparu (c)	120	31,6
Acide acétique formé (e)	51	14,9
Acide acétique formé :		
1° par le dédoublement de l'acide citrique ($\frac{c}{3}$)	40	10,5
2° par le dédoublement de l'acide oxalacétique ($e - \frac{c}{3}$)	11	4,4
Acétoïne formée (a)	5,3	0
Butanediol formé (b)	5,1	2,8
c calculé :		
$c = \frac{c}{3} + 2\left(e - \frac{c}{3}\right) + 4a + 4b$	103,6	30,5

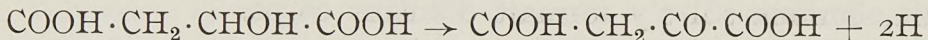
Nous obtenons une vérification suffisamment bonne, dans le cas du vin au moins, pour que nous puissions penser d'une part que tous les corps formés ont été reconnus et dosés, d'autre part que les équations hypothétiques précédentes, d'ailleurs *a priori* probables, représentent la réalité des phénomènes.

Au lieu de ces bilans complets de la fermentation, on peut établir simplement le bilan de l'hydrogène, dans le cas du vin, en négligeant la formation de diacétyle. Le butanediol formé, qui consomme 2 H, doit être égal à l'acide acétique apparu à partir de l'acide oxalacétique dont la formation fait apparaître 2 H. Cette relation se vérifie bien.

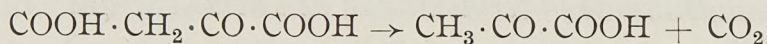
En résumé, les chiffres expérimentaux correspondent assez bien avec les chiffres théoriques, pour qu'on puisse considérer comme démontré le passage par le stade oxalacétique (ou ses produits de décarboxylation) et les réactions que nous avons formulées, dans la fermentation de l'acide citrique par les bactéries lactiques. Il est bien entendu, d'ailleurs, que les données générales de la biochimie rendent ces réactions très vraisemblables.

Transformation de l'acide malique par les bactéries lactiques

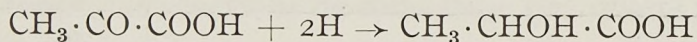
L'étude précédente de la fermentation de l'acide citrique permet de discuter le mécanisme de la fermentation malolactique dont la réaction globale a été donnée plus haut. Le schéma le plus probable est celui admettant comme premier terme de la réaction une déshydrogénation conduisant à l'acide oxalacétique :



L'acide oxalacétique est ensuite décarboxylé :



et l'acide pyruvique formé est réduit en acide lactique par l'hydrogène libéré dans la première réaction, ce qui nécessairement conduit à un acide lactique inactif et expliquerait les observations de DUTOIT et DUBOIX :



Au premier abord il semble inexplicable, les produits de la fermentation des acides malique et pyruvique n'étant pas les mêmes, que ces deux fermentations comportent l'une et l'autre les mêmes intermédiaires. Mais il faut considérer que dans la fermentation lactique de l'acide malique, le sort de l'acide pyruvique ayant à sa disposition la quantité d'hydrogène nécessaire à sa réduction, ne saurait être le même que lorsque cet acide est à l'origine seul dans le milieu. Il en est un peu ainsi, pour donner un

autre exemple dans la chimie des fermentations, lorsque de l'éthanal est ajouté en surplus à une fermentation alcoolique ; il donne alors de l'acide acétique, de l'acide succinique, du butanediol et il ne subit pas le sort habituel de l'éthanal dans la fermentation alcoolique qui est sa réduction en alcool éthylique, parce qu'il ne trouve pas en face de lui l'hydrogène nécessaire.

Comme pour la fermentation de l'acide citrique, les acides oxalacétique et vraisemblablement pyruvique restent donc bien également les termes intermédiaires les plus probables de la fermentation malolactique, et on s'explique que les mêmes bactéries ne forment pas (ou pas sensiblement) d'acide lactique à partir de l'acide citrique et ne forment que de l'acide lactique à partir de l'acide malique, résultat surprenant au premier abord.

II. — Etude des conditions techniques de la fermentation malolactique

Dans les conditions naturelles de la production et de la conservation des grands vins rouges, la fermentation malolactique se produit presque toujours ; il n'en est pas de même dans le cas des vins blancs. Il importait de préciser la nature et l'importance des facteurs qui interviennent pour la favoriser ou l'empêcher ou, tout au moins, la retarder ; il importait de mieux connaître certains effets de l'acidité du milieu, de la présence d'oxygène, de l'addition d'acide sulfureux, également l'influence de la nature du cépage et de la durée de conservation du vin.

Influence du cépage

Il était intéressant de suivre la fermentation malolactique des vins de cépages purs. Nous avons donc vinifié séparément les trois cépages rouges fins du Bordelais : Malbec, Cabernet et Merlot. Après la fermentation alcoolique qui a duré 15 jours, des échantillons des trois vins obtenus ont été prélevés, stérilisés par chauffage à 60°, puis analysés.

Le tableau XXI donne la composition comparée des trois vins obtenus. Ce tableau permet des comparaisons que l'on a rarement l'occasion de faire, les vins du Bordelais étant toujours obtenus à partir d'un mélange de cépages. La correspondance satisfaisante entre la somme des anions et la somme des cations prouve que les dosages effectués sont corrects, en particulier celui de l'acide malique, le plus difficile et le plus important.

Il résulte des données du tableau XXI qu'au moment du prélèvement, le vin de Merlot avait subi complètement la fermentation malolactique avec décomposition de l'acide citrique, que le vin de Cabernet, un peu

plus acide, était en cours de fermentation malolactique, enfin, que le vin de Malbec encore plus acide n'avait pas encore subi cette fermentation.

TABLEAU XXI

Fermentation malolactique de vins provenant de divers cépages

Sauf indication contraire, tous les chiffres sont des milliéquivalents par litre

	Vin de Malbec	Vin de Cabernet	Vin de Merlot
Alcool	11°1	11°3	11°8
Sucre	1,35	1,35	1,4
Glycérol	8,8	8,1	8,7
Indice de permanganate :			
Vin total	66,5	77,5	76,5
Colorant	52	61,5	61
Tanin	17	16,7	17
pH	3,25	3,25	3,5
Acidité de titration	102,7	84,4	69,9
Alcalinité des cendres	23,0	21,6	19,2
Ammoniaque	3,8	2,4	1,2
<i>Somme des cations</i>	129,5	108,4	90,3
Acide tartrique	52,3	50,0	42,7
— malique	36,5	13,6	1,5
— citrique	3,4	3,8	0,8
— lactique	12,6	17,6	21,4
— succinique	16,1	16,1	16,1
— acétique	5,8	5,5	8,3
<i>Somme des anions</i>	126,7	106,6	90,8
Fermentation malolactique supposée achevée :			
Diminution d'acidité calculée	18,2	6,8	0,7
Acide lactique calculé	30,8	24,4	22,1
Acidité de titration calculée	84,5	77,6	69,2

En somme la fermentation a été d'autant plus aisée que l'acidité initiale était plus faible.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats des analyses faites par PEYNAUD sur les moûts de 1937 et 1938 : le jus de Malbec est le plus riche en acide malique (50 à 56 méq), celui de Merlot le plus pauvre (19 à 24 méq), celui de Cabernet ayant un taux intermédiaire (38 à 39 méq). Par contre la concentration de l'acide tartrique (75 à 130 méq) n'est pas liée régulièrement à la nature du cépage ; cet acide précipite pour une très grande part sous forme de bitartrate de potassium au cours de la fermentation puis de la conservation. Finalement l'acidité du vin obtenu est liée à la concentration du moût en acide malique ; telle est la conception développée par PEYNAUD dont nous trouvons ici une application.

Les cépages les plus riches en acide malique, donnent les vins les plus acides, mais les chutes d'acidité, lorsque la fermentation malolactique est

terminée, sont plus importantes dans les vins les plus acides. Finalement la fermentation malolactique régularise dans une large mesure, l'acidité des vins de divers cépages ; elle atténue les écarts initiaux.

Influence de l'acidité

On sait que le pH des vins possède un effet sélectif et réalise, en quelque sorte, un triage des bactéries susceptibles d'attaquer tel ou tel constituant des vins et des constituants susceptibles d'être décomposés. A mesure que le pH s'abaisse, de nouveaux types de bactéries se trouvent inhibés. D'après les observations de RIBÉREAU-GAYON l'acide malique est le plus aisément attaqué dès pH 3, l'acide tartrique au-dessus de pH 3,5 seulement, les sucres et le glycérol à des pH intermédiaires.

Nos expériences sur ce sujet ont consisté à ensemen­cer une série d'échantillons d'un même vin amené à des pH différents avec des bactéries lactiques apportées par des dépôts de vins divers. Les expériences ont porté sur plusieurs types de vins ainsiensemencés.

Nous avons constaté que toutes ces bactéries décomposent l'acide malique, certaines dès pH 3, mais d'autres seulement à un pH plus ou moins supérieur à 3.

Il se trouve que ce sont les bactéries isolées des vins de pH élevé qui ne fermentent pas, ou difficilement, l'acide malique des milieux de pH relativement faibles ; au contraire, plus le pH du vin initial est faible, plus la bactérie agit à pH faible. Autrement dit le pH d'arrêt de bactéries provenant d'un vin, blanc ou rouge, est en rapport étroit avec le pH de ce vin.

TABLEAU XXII

Fermentation malolactique dans un vin à différents pH
par des souches d'origines différentes

Les chiffres expriment les acidités de titration (AT) et volatiles (AV)
en milliéquivalents par litre

pH		Témoin non ensemencé	Origine des souches				
			Vin rouge pH 3,3	Vin rouge pH 3,4	Vin rouge pH 3,6	Vin blanc pH 3,8	Vin blanc pH 3,87
2,95	A. T.	181	147	180	180	180	180
	A. V.	7,4	7,2	7,4	7,4	7,4	7,4
3,23	A. T.	160	114	109	160	157	160
	A. V.	7,4	7,4	7,2	7,2	7,4	7,4
3,40	A. T.	140	90	92	90	93	136
	A. V.	7,4	11,9	11,9	11,9	7,5	7,5
3,70	A. T.	108	74	74	63	73	79
	A. V.	7,5	11,9	10,2	6,2	7,5	9,7
4,15	A. T.	74	47	41	56	35	
	A. V.	7,5	11,9	7,5	7,9	11,9	

Par exemple le tableau XXII donne, pour un vin blanc ensemencé avec différents dépôts, les résultats obtenus après deux mois de conservation à la température du laboratoire (18°). La diminution de l'acidité de titration par rapport au témoin à même pH indique l'existence d'une fermentation malolactique. On reconnaît aussitôt le fait qui vient d'être exposé et qui s'explique par un effet sélectif du pH dans le vin d'où sont originaires les souches. Ce phénomène doit évidemment intervenir dans la conservation et les manipulations des vins.

On notera que dans l'expérience du tableau XXII, des augmentations notables d'acidité volatile, de l'ordre de 4 méq, ne se sont produites que pour les pH élevés, à pH 3,4 et au-dessus.

Influence de l'oxygène

Les bactéries malolactiques des vins qui appartiennent au groupe général des bactéries lactiques peuvent se développer en présence d'oxygène dissous dans le liquide. Elles ne sont nullement anaérobies, comme on l'affirme souvent en œnologie, en les opposant aux bactéries acétiques dont le développement exige l'existence prolongée d'une surface de contact entre le liquide et l'air atmosphérique. Ces bactéries, qui sont les agents de la fermentation malolactique et aussi des maladies des vins n'exigent pas ce contact ; elles vivent dans la masse du vin ou même à la partie inférieure des récipients, mais elles ne sont nullement gênées par la présence d'oxygène dissous. Ces observations ont été faites par MÜLLER-THURGAU, et plus récemment par RIBÉREAU-GAYON.

A partir des dépôts de vin, et à l'aide des techniques d'isolement sur milieu solide décrites par RIBÉREAU-GAYON, nous avons obtenu des cultures pures et nous avons constaté, ce qui confirme les conclusions des auteurs précédents, que toutes ces cultures peuvent se développer aussi bien dans des tubes en aérobiose simplement bouchés par de la ouate et maintenus à l'air, que dans des tubes placés à l'abri de l'air. On utiliserait des flacons clos contenant du pyrogallate de potassium qui absorbe très fortement l'oxygène ; les tubes de culture étant obturés par de la ouate, l'oxygène qu'ils renferment diffuse jusqu'à épuisement dans le bocal au fur et à mesure de l'absorption par le pyrogallate.

Le tableau XXIII relatif à une expérience particulière, prise entre plusieurs semblables, fait notamment ressortir ce fait que la désacidification se poursuit aussi bien à l'air qu'à l'abri de l'air. On observe parfois que la chute de l'acidité de titration, exprimée toujours en méq par litre, est plus rapidement complète en anaérobiose.

Mais l'état d'aération d'un milieu, et son influence à cet égard vis-à-vis du développement des microorganismes, ne peuvent être correctement définis que par son potentiel d'oxydo-réduction qui est une expression

du niveau plus ou moins oxydant ou plus ou moins réducteur du milieu. On conçoit combien il est difficile de définir en intensité et en durée un certain état d'aération par les conditions opératoires ; au surplus le milieu, selon sa composition, réagit très différemment à un apport déterminé d'oxygène.

Le tableau XXIII donne donc en même temps que la diminution de l'acidité de titration, le potentiel d'oxydoréduction mesuré à l'aide du rH-mètre Quéré, au moment où étaient effectués les titrages des acides, aussitôt après l'ouverture des tubes. Ces potentiels sont toujours exprimés en millivolts. Précisons que l'expérience comportait plusieurs tubes identiques et qu'un tube ne servait qu'à une seule détermination. Le tableau XXIII donne en même temps dans une autre colonne les potentiels des tubes identiques non encore ensemencés ; la comparaison des deux colonnes fait ressortir la manière dont le niveau d'oxydo-réduction du milieu réagit au développement des bactéries.

TABLEAU XXIII

Influence de l'oxygène sur la fermentation malolactique

pH et acidité de titration	Nombre de jours	En aérobiose			En anaérobiose		
		Potentiel sans ensemencement mv	Potentiel avec ensemencement mv	Diminution de l'acidité még	Potentiel sans ensemencement mv	Potentiel avec ensemencement mv	Diminution de l'acidité még
pH 3,21	8	540	500	22	370	310	35
Acidité	16	570	520	26	320	270	35
157 még	24	550	535	29	330	280	35
pH 3,52	8		480	25	340	240	35
Acidité	16	550	490	29	340	255	35
135 még	24	570	510	29	300	240	35
pH 3,83	8	540	480	32	330	240	35
Acidité	16	510	480	32	310	210	35
112 még							

On voit que des conditions d'aération très différentes, clairement exprimées par un important écart de potentiel entre les essais en aérobiose et les essais en anaérobiose, modifient peu la marche de la fermentation malolactique. On voit, en outre, comme on pouvait s'y attendre, que par rapport aux potentiels des témoins non ensemencés, l'écart est plus important en anaérobiose qu'en aérobiose.

L'état d'oxydoréduction d'un milieu peut également s'exprimer par le rH calculé par la relation :

$$rH = \frac{E + 0,06 pH}{0,03}$$

Dans l'expérience du tableau, XXIII, le rH est, lorsque varie le pH, plus constant que le potentiel ; il est voisin de 25 en aérobiose et de 16 en anaérobiose.

Influence de l'anaérobiose absolue

Une objection pouvait être faite à l'expérimentation précédente. Les vins dits « en anaérobiose » en réalité n'étaient placés à l'abri de l'air, dans des flacons renfermant du pyrogallate, qu'au moment où ils venaient d'être ensemencés, et leur potentiel initial, au temps 0, étaient en réalité le même que dans les vins dits « en aérobiose ». La différence de condition n'était réalisée que progressivement, et sans doute après qu'ait commencé le développement des bactéries.

Nous avons donc constitué d'autres expériences qui comportaient, en plus des conditions précédentes (aérobiose et anaérobiose,) une troisième série dite « en anaérobiose immédiate » dont les vins étaient placés à l'abri de l'air, sous pyrogallate, un mois avant l'ensemencement. Au moment de l'ensemencement, les tubes étaient rapidement sortis du bocal à pyrogallate et ; après introduction de quelques gouttes de culture, replacés aussitôt dans les bocaux. La diffusion d'oxygène dans ces conditions est infime ; le milieu est complètement privé d'oxygène, avec dès le départ un potentiel beaucoup plus bas que dans les autres conditions : moins de 300 mv au lieu de 460.

D'une manière plus précise tous les tubes avaient été placés un mois à l'avance sous pyrogallate ; ceux qui constituaient ensuite les séries « aérobiose continue » et « anaérobiose progressive » étaient saturées d'oxygène par des agitations dans l'air au moment de l'ensemencement.

Le tableau XXIV donne le résultat d'une expérience ainsi conduite. Les deux premières colonnes (aérobiose continue et anaérobiose progressive) qui correspondent exactement aux conditions de l'expérience du tableau XXIII (aérobiose et anaérobiose) donnent les mêmes résultats que celle-ci. Par contre, dans le cas d'« anaérobiose immédiate » que l'on pourrait également appeler anaérobiose continue ou absolue, la fermentation malolactique a été beaucoup plus pénible et même ne s'est pas accomplie à pH 3,45.

C'est là un résultat nouveau. Non seulement la présence d'oxygène ne gêne pas la fermentation malolactique, ce qui est déjà contraire à certaines conceptions admises, mais en outre elle la favorise, et même un apport d'oxygène au milieu, au moins en petite quantité, doit être nécessaire dans certaines conditions.

Cette expérience, renouvelée plusieurs fois sur divers types de vin, n'a pas toujours donné des résultats aussi nets, mais en aucun cas l'anaérobiose absolue n'a favorisé la fermentation malolactique.

TABLEAU XXIV

Effet de l'anaérobiose absolue sur la fermentation malolactique

	Nombre de jours	En anaérobiose continue		En anaérobiose progressive		En anaérobiose immédiate	
		Potentiel mv	Diminution de l'acidité méq	Potentiel mv	Diminution de l'acidité méq	Potentiel mv	Diminution de l'acidité méq
pH 3,45	0	460	0	460	0	300	0
	6	440	8	300	8	310	0
	12	420	11	285	9	300	1
pH 3,82	0	450	0	460	0	260	0
	6	490	11	300	11	260	5
	12	470	11	260	11	270	6

Influence de l'acide sulfureux

Le tableau XXV résume des expériences effectuées pendant plusieurs années sur la vinification en blanc à partir de vendanges peu ou pas botrytisées. Les fermentations avaient toujours lieu en barriques de 225 litres. Le tableau rassemble les résultats des analyses effectuées en fin de fermentation, comparativement sur les vins issus de moûts non sulfités et sur les vins issus de moûts sulfités. Dans tous les cas l'addition d'acide sulfureux avait été faite avant fermentation.

Ces résultats sont présentés sous forme de bilans de variations dans lesquels, si les dosages sont corrects et si tous les acides ont été dosés, la somme algébrique des variations des acides doit être égale à la somme des variations de l'acidité de titration et de l'alcalinité des cendres. Cette dernière peut varier par précipitation de bitartrate de potassium ou de tartrate de calcium.

En outre, les mêmes dosages ont été faits, pour chaque vin du tableau, sur un fût sulfité et « débourbé », c'est-à-dire soutiré deux jours après sulfitage du moût afin de séparer la plus grande masse de « bourbes ». Les résultats analytiques ayant été en général très voisins de ceux concernant les fûts simplement sulfités, nous ne les faisons pas figurer sur le tableau.

En conclusion de ces expériences, on voit que la fermentation malolactique est générale et normale dans ce type de vin, mais que l'addition d'acide sulfureux l'empêche.

TABEAU XXV

Sulfitage des moûts et fermentation malolactique des vins blancs
Les concentrations sont exprimées en milliéquivalents par litre

Date des analyses	pH	Sucre g	Acidité totale	Alcalinité des cendres	Variation de l'acide corrigée	Acide tartrique	Acide malique	Acide lactique	Acide citrique	Acide acétique	Somme des variations des acides
Récolte 1948											
Novembre 1948			63	— 4,8	— 18,8	40,0	8,6	24,3	3,2	11,0	— 20,3
			77			49,6	32,6	14,0	4,0	7,2	
Avril 1948			76	— 1,8	— 11,8	— 9,6	— 24	+ 10,3	— 0,8	+ 3,8	— 7,1
			86			35,6	0	18,4	3,8	9,9	
			— 10	— 3	— 13	39,3	12,0	10,0	4,1	9,4	— 12,5
			— 3,7			— 12,0	+ 8,4	— 0,3	+ 0,5		
Récolte 1949											
Novembre 1949			70	+ 1,5	— 11,5	36,1	0	14,5	2,3	12,5	— 6,7
			83			35,6	16,0	5,7	5,8	9,4	
Avril 1949			— 13	— 3	— 19,1	+ 0,9	— 16	+ 8,8	— 3,5	+ 3,1	— 23,7
			76			24,9	0	11,5	0,8	14,4	
			86	— 4,1	— 17,2	30,2	18	3,2	4,3	8,4	— 15,1
			— 10			— 5,3	— 18	+ 8,3	— 3,5	+ 6,0	
Récolte 1950											
Novembre 1950			76	— 2,7	— 17,7	31,3	3	13,2	4,4	10,9	— 19,1
			91			37,3	23	3,1	4,7	10,6	
			— 15	— 3,2	— 17,2	— 6	— 20	+ 10,1	— 0,3	+ 0,3	— 23,7
			90			39,4	25	2,7	4,8	10,0	
			— 14	— 4,1	— 19,1	— 8,1	— 22	+ 10,5	— 0,4	+ 0,9	— 15,1
			91			41,2	24	4,0	4,0	11,5	
			— 15	— 10,9	— 21	+ 9,2	— 0,4	— 0,6			

Fermentation malolactique des vins blancs

Les résultats analytiques du tableau XXV font partie d'une expérimentation sur la vinification en blanc que nous avons poursuivie méthodiquement en 1948, 1949 et 1950.

Dans nos expériences de 1948, nous avons pu constater l'existence normale de la fermentation malolactique dans les vins blancs secs de la région des Graves produits à partir de raisins en majeure partie non atteints de pourriture. Nous avons constaté en même temps l'effet empêchant du sulfitage trop fort avant la fermentation ou encore intervenant trop tôt en fin de fermentation alcoolique.

En 1949, dans des expériences analogues, comportant toujours des fermentations en barriques de 225 litres, la fermentation malolactique était terminée à la fin de la fermentation en barriques, lorsque les moûts n'avaient pas reçu d'acide sulfureux. Par contre, comme en 1948, elle ne s'était pas produite dans les vins ayant reçu avant ou après la fermentation alcoolique 150 ou 200 mg d'acide sulfureux par litre, ces doses étant parfois utilisées en vinification pour réaliser le débourage.

En ce qui concerne les caractères organoleptiques, on observait que les vins désacidifiés n'étaient pas beaucoup plus « moelleux » et « gras » que les vins vinifiés avec acide sulfureux ; ils paraissaient plutôt plus mous. D'autre part, ils avaient peu d'odeur, étaient moins fruités que les vins provenant de moûts sulfités.

A première vue, les effets de la fermentation malolactique paraissaient donc assez différents de ce qu'ils sont dans le cas des vins rouges. Au moins un peu d'acide sulfureux paraît nécessaire à la qualité de ces vins, et normalement c'est effectivement en présence d'un peu d'acide sulfureux au moins que ces vins sont présentés à la consommation.

Dans les mois qui ont suivi la récolte, ces caractères se sont accentués. En outre, les vins vinifiés avec 100 ou 150 mg d'acide sulfureux, s'étant alors désacidifiés comme le témoin non sulfité, présentaient les caractères de vins malades : gazeux, avec disparition du « fruité », très légère augmentation d'acidité volatile (2 à 3 méq), avec diminution de l'acidité de titration (5 à 6 méq). Mais il faut reconnaître que dans les conditions de la pratique normale, ces vins auraient été soutirés, aérés et légèrement sulfités. C'est pourquoi dans les expériences qui suivent, nous avons cherché à respecter ces conditions normales.

En 1950 nous avons répété à nouveau ces expériences et réalisé des sulfitages de moût à raison de 50, 100 et 200 mg d'acide sulfureux par litre. Ces sulfitages ont légèrement retardé le départ de la fermentation alcoolique qui a été conduite, comme précédemment, en barriques de 225 litres. A la fin de la fermentation alcoolique, les vins non sulfités

avaient subi la fermentation malolactique ; tandis que les vins sulfités, même à faible dose, étaient restés plus acides.

Ici encore, au point de vue des caractères organoleptiques, les vins paraissaient d'autant mieux réussis qu'ils avaient été plus sulfités.

Ces vins ont été soutirés 15 jours après la fin de la fermentation alcoolique et additionnés de 50 mg par litre d'acide sulfureux, puis analysés et dégustés en décembre. La fermentation malolactique ne s'était toujours pas produite dans les vins additionnés de 100 ou 300 mg par litre d'acide sulfureux.

D'une façon générale, les caractères organoleptiques s'étaient beaucoup améliorés par cette opération. L'odeur agréable de ce type de vin s'était développée, en particulier dans les vins désacidifiés ; les vins sulfités avant fermentation étaient ici nettement plus acides et moins « cou-lants » que les vins non sulfités.

Finalement il apparaît que la fermentation malolactique est un phénomène général dans le cas des vins blancs du Bordelais issus de vendanges non attaquées par le *Botrytis cinerea* ou pour une faible proportion seulement, à la condition que les moûts ne soient pas sulfités, ou très légèrement ; et il apparaît que sous réserve que le vin produit subisse des soins normaux comportant des aérations et des sulfitages, cette fermentation malolactique est ici encore un facteur de qualité ; cette fermentation reprend dans ces vins l'intérêt qu'elle offre dans le cas général.

Comme dans le cas des vins rouges, on doit considérer trois ordres de faits essentiels :

1° Une acidité un peu élevée s'oppose à la qualité, au développement du « gras et du moelleux » du vin, même si le vin n'est pas vert à proprement parlé ;

2° La fermentation malolactique est un puissant facteur de diminution de l'acidité, qui se rapproche ainsi du taux optimum ;

3° L'acide sulfureux ajouté, même à faible dose avant ou après la fermentation principale, s'oppose à la fermentation malolactique.

Ces faits ne sont pas nouveaux pour les vins blancs en général car ils ont été signalés depuis longtemps en Suisse, en Italie, en Bourgogne et en Anjou, mais ils sont nouveaux pour les vins blancs du Bordelais. Sans doute tous les vins blancs du Bordelais ne subissent pas cette fermentation malolactique ; seuls les vins issus de vendanges non ou peu pourries l'ont manifesté avec ses conséquences heureuses, par exemple les vins secs de la région de Blaye ou de Castillon.

Les expériences relatées ici illustrent la nécessité pratique d'étudier et de préciser, beaucoup plus qu'il n'a été fait jusqu'à maintenant, les détails des procédés de vinification, si l'on veut obtenir sûrement la meilleure qualité.

Nous avons précédemment vu que dans le cas des vins de Sauternes

issus de vendanges fortement botrytisées, il n'est généralement pas possible, même sans anhydride sulfureux, d'obtenir une diminution d'acidité par fermentation malolactique. Si les progrès qu'il est possible d'apporter à l'élaboration des grands vins blancs secs sont pour une grande part subordonnés au respect des conditions qui permettent un meilleur développement de la fermentation malolactique, par contre dans le cas des grands vins blancs doux, on ne peut semble-t-il rien attendre de ces conditions et toute l'attention doit être portée sur l'activité du *Botrytis conerea*.

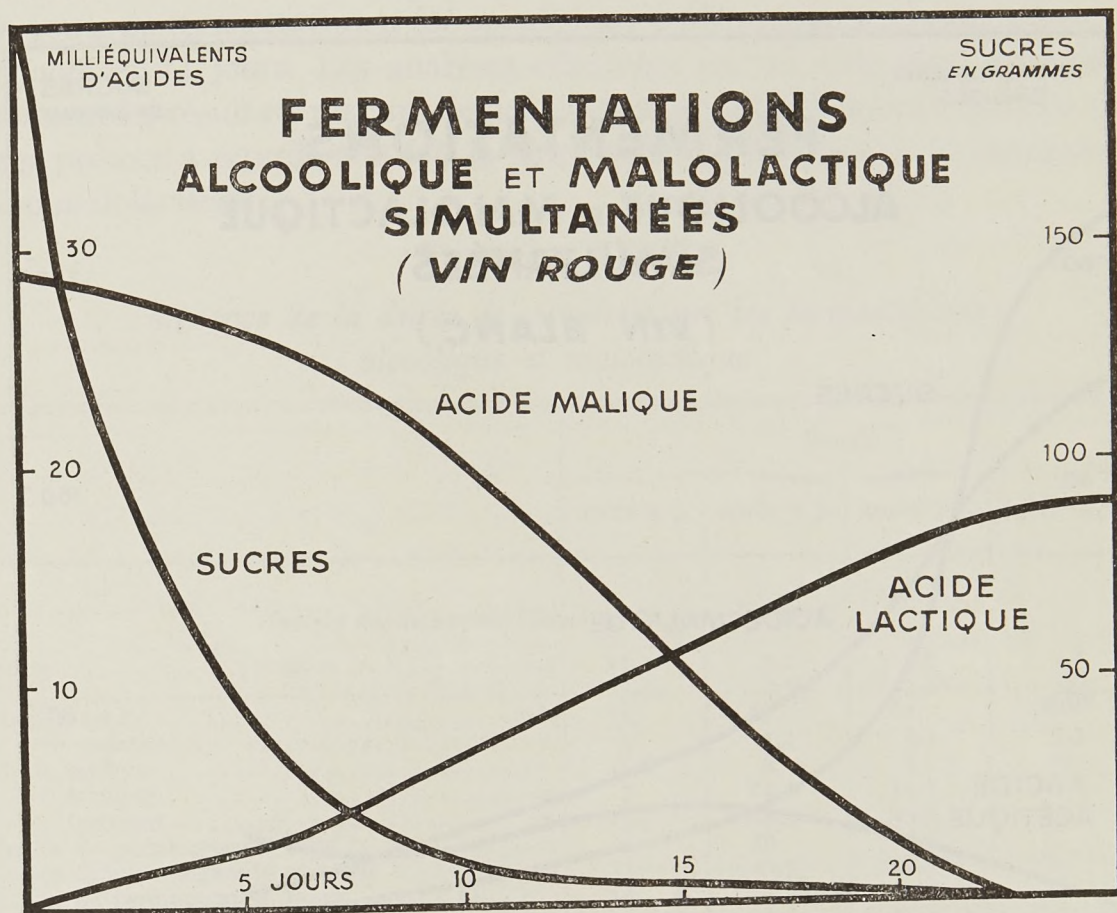


FIG. 7.

Fermentation alcoolique et fermentation malolactique

Nous avons pu observer dans une vinification en rouge et dans une vinification en blanc, une fermentation malolactique accompagnant la fermentation alcoolique, débutant bien avant la fin de la fermentation complète du sucre. Dans l'un et l'autre cas, nous avons suivi par l'analyse les variations de l'acide malique et de l'acide lactique, au cours de la fermentation alcoolique, ce qui, pensons-nous, n'avait pas encore été effectué.

Dans le cas du vin rouge qui a été fermenté en cuve (figure 7) l'acide malique a commencé de diminuer dès le commencement de la fermentation, puis a subi une chute notable et rapide à partir du moment où

il restait encore 20 g de sucre par litre. Au moment de l'écoulage de la cuve, ou décuvaision, la transformation était complète.

Dans le cas du vin blanc qui a été fermenté en barrique de 225 litres (figure 8) la disparition de l'acide malique a eu lieu en même temps que la disparition du sucre ; les bactéries peuvent donc décomposer l'acide malique sans décomposer les sucres et former, à partir d'eux, de notables proportions d'acides lactique et acétique. On sait d'ailleurs par les travaux de PEYNAUD (22), qu'une fraction valable de l'acide malique est fermentée par la levure.

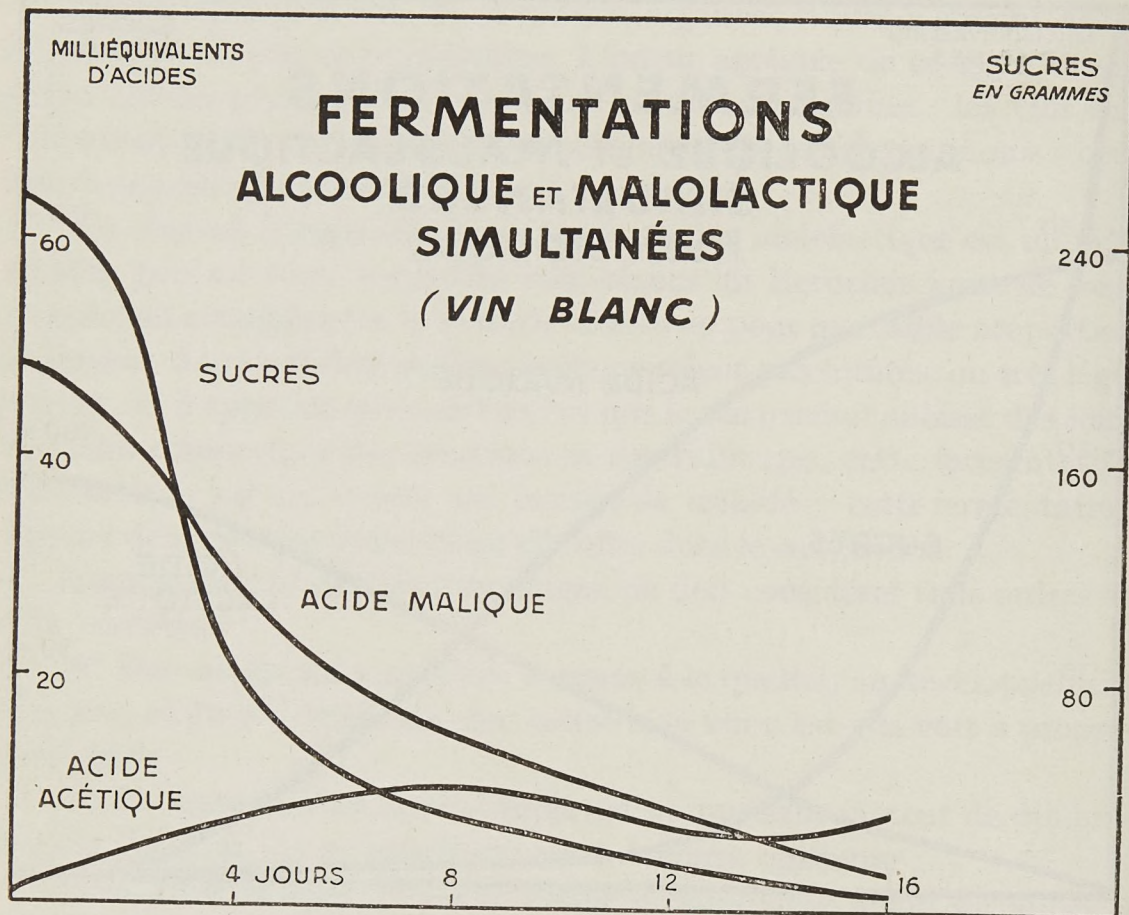


FIG. 8.

Cependant, dans une expérience où il y a eu arrêt de fermentation, laissant 18 g de sucre non fermenté, l'acide lactique était plus élevé de 6 méq et l'acidité volatile de 3 méq que dans le témoin ayant subi les deux fermentations sans accident. Environ 1 g de sucre avait été décomposé par les bactéries.

Dans toutes nos observations, pour les vins n'ayant pas reçu d'acide sulfureux, ou ayant reçu des doses égales ou inférieures à 100 mg/l avant la fermentation alcoolique, la désacidification biologique a eu lieu dès la fin de la fermentation alcoolique et au plus tard dans le mois qui a suivi la fermentation (résultats du tableau XXV par exemple). Ce n'est que dans

les cas où l'addition d'acide sulfureux avant fermentation dépassait 120 mg que l'on observait la fermentation malolactique qu'au printemps.

Toutes ces observations ont été faites dans les conditions normales de la pratique. Elles apportent la preuve que l'on peut dans de tels cas obtenir la fermentation malolactique très tôt et sans accident. Ce doit être l'un des buts essentiels des techniques de vinification.

La durée de cuvaïson peut avoir une influence sur la durée de la fermentation malolactique. Dans une expérience dont le but était l'étude de la vinification d'un vin rouge de Bordeaux, type Clairet, une grande cuve en cours de fermentation a été écoulee par fraction après 3 jours, 5 jours, 7 jours et 14 jours. Les analyses effectuées sur les vins ainsi produits donnent les résultats rassemblés dans le tableau XXVI montre que l'écoulage précoce a retardé à la fois la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique.

TABLEAU XXVI

Influence de la durée de cuvaïson sur les fermentations alcoolique et malolactique

	Écoulé			
	après 3 j.	après 5 j.	après 7 j.	après 14 j.
<i>Analyse aussitôt après l'écoulage (2 novembre 1949) :</i>				
Sucre	11,5	5,0	3,6	1,8
pH	3,49	3,56	3,58	3,62
Acidité totale	75	69	62	62
— volatile	5	5,3	5,9	7,5
Acide malique	14,8	6	3	0
— lactique	7	14,2	14,2	17,0
— tartrique	25,5	25,3	25,0	25,0
Indice de permanganate total	44	56	62,5	71
Indice de permanganate colorant	33	43,5	48,5	62
Indice de permanganate tanin	12	14,5	15,5	
Intensités colorantes relatives	37,5	50	75	100
<i>Analyse des mêmes vins en mars 1950 :</i>				
Sucre	3,6	1,8	1,8	1,8
pH	3,5	3,55	3,54	3,51
Acidité totale	65	54	67	65
— volatile	5,3	5,6	7,2	8,1
Acide malique	0	0	3	0
— citrique	3,6	3,5	3,6	3,8
— tartrique	18,4	20,7	21,4	22
— lactique	13,7	15	15	15,5
Indice de permanganate total	50	60	70,5	80
Indice de permanganate colorant	33	39	56	60
Indice de permanganate tanin	16	15	16	22

GARINO-CANINA avait signalé l'influence défavorable sur la fermentation malolactique de la suppression du contact du jus de raisin avec des particules solides ; sans doute l'abaissement de température intervient également.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Le chapitre I est consacré aux méthodes analytiques utilisées dans ce travail et auxquelles nous avons apporté une contribution personnelle: acide lactique, glycérol, acide gluconique.

* * *

Dans le chapitre II nous étudions d'abord les conditions de l'invasion des vignobles par le *Botrytis cinerea*, qui conduit, suivant les circonstances atmosphériques, à la pourriture grise, très préjudiciable à la qualité du vin, ou à la pourriture noble, qui permet au contraire l'obtention de vins de grande qualité.

Après un relevé de nos connaissances sur la pourriture noble, nous relatons nos essais de cultures pures de *Botrytis* au laboratoire à la surface du moût de raisin. Cette technique permet de faire varier les conditions de culture et de comparer l'action des diverses souches de *Botrytis*. La combustion des sucres a été ainsi chiffrée, de même que celle des acides. Les acides tartrique et malique sont identiquement attaqués, tandis qu'apparaissent dans les milieux de culture d'autres acides, en particulier l'acide citrique. Cette formation est soumise aux conditions d'acidité du milieu. Aux pH bas, on constate toujours une désacidification par combustion des acides ; au contraire aux pH élevés, il y a généralement acidification, par production d'acide citrique. Cette fermentation citrique, qu'on retrouve pour un grand nombre de moisissures, a été rattachée au phénomène respiratoire et au cycle tricarboxylique de KREBS.

Nous avons démontré la présence d'acide gluconique dans les moûts attaqués. Cet acide provient d'une oxydation directe du glucose par l'intermédiaire de la glucose-oxydase. Cette formation, connue comme une propriété d'un grand nombre de champignons, n'avait jamais été indiquée chez le *Botrytis cinerea*. Enfin, les bilans acidimétriques montrent qu'il se forme encore d'autres acides, que nous n'avons pu identifier.

La production de glycérol, découverte par LABORDE, a été confirmée. On peut la considérer comme liée à une transformation glycéropyruvique aérobie du sucre. Des essais à différentes acidités ont montré qu'aux pH élevés la formation est plus faible, ou plus exactement que la combustion du glycérol formé est plus forte.

Nous avons suivi l'action du *Botrytis* au vignoble même, par des analyses comparatives détaillées de raisins sains et de raisins pourris. Les résultats de chaque analyse sont exprimés sous deux formes différentes : par rapport à un certain nombre de grains de raisin, ce qui permet de saisir le phénomène physiologique indépendamment de la concentration par évaporation d'eau, et la valeur rapportée au litre de moût qui donne la somme des deux actions.

Nous retrouvons dans l'action physiologique du *Botrytis*, avec quelques variantes, ce qui a été observé en cultures pures. La proportion de sucre brûlé dans le raisin peut atteindre 35 à 44 p. 100. La qualité exceptionnelle des vins de pourriture noble ne peut s'obtenir que par une perte considérable de quantité. L'action sur l'acidité s'est montrée un peu différente in vivo et in vitro, et l'acide malique a été beaucoup moins attaqué dans le raisin qu'il ne l'est en culture liquide. Nous avons cherché une explication à cette différence. De même sur raisin, nous n'avons jamais observé la formation d'acide citrique. Par contre, l'acide gluconique et le glycérol ont toujours été retrouvés dans les raisins botrytisés.

Le phénomène physique de concentration a été étudié. Ces transformations profondes du raisin expliquent la composition particulière de ces vins. Ils présentent les caractères analytiques de vins concentrés, sans que tous les éléments cependant soient concentrés de la même façon. En particulier l'acide tartrique de ces vins est toujours relativement faible. Au point de vue acidimétrique, ils se différencient par la plus grande richesse en acides faibles et par un taux de salification des acides plus élevé.

Finalement la vinification des vins liquoreux à l'aide de la pourriture noble peut être représentée comme un moyen pour le viticulteur d'obtenir des vins plus riches, sans multiplier cependant par le même facteur le sucre et l'acidité. L'utilisation du *Botrytis* se présente, en somme, comme une véritable technique de désacidification biologique des vins. Cette désacidification, qui s'attaque surtout à l'acide tartrique, joue pour ces vins, le même rôle que la fermentation malolactique, à l'étude de laquelle est consacré le chapitre III, joue pour les autres vins, en faisant disparaître l'acide malique.

* * *

Dans le chapitre III, avant d'étudier les facteurs qui agissent sur la fermentation malolactique ou fermentation de l'acide malique par certaines bactéries du vin avec formation d'acide lactique et de CO₂, nous avons cherché à élucider son mécanisme chimique qui n'avait jamais été envisagé par les œnologues. Nous avons d'abord étudié le mécanisme de la fermentation de l'acide citrique; nos déterminations quantitatives rendent très probable l'hypothèse selon laquelle l'acide oxalacétique et l'acide pyruvique sont des termes intermédiaires de la dégradation de l'acide citrique et il est très probable qu'ils sont aussi des intermédiaires de la fermentation malolactique.

L'acide pyruvique, lorsqu'il provient de l'acide citrique, donne naissance à de l'acide acétique, du 2,3 butanediol, de l'acétylméthylcarbinol ou acétoïne. Par contre, lorsqu'il provient de l'acide malique, l'acide pyruvique trouve en face de lui, provenant de la déshydrogénation de l'acide malique, une quantité d'hydrogène équivalent qui le réduit entièrement en acide lactique. Il y a réduction et oxydation couplées.

Nous montrons que le 2,3 butanediol d'un vin ne provient pas unique-

ment de la fermentation alcoolique, mais pour une fraction, de l'ordre de 5 à 10 p. 100, de l'acide citrique.

Les circonstances et les conséquences de la fermentation malolactique ont été étudiées depuis longtemps dans le cas des vins rouges ou des vins blancs secs, mais très peu dans celui des vins blancs issus de vendanges plus ou moins botrytisées et pour cette raison assez fortement sulfitées. Deux questions d'ordre technique se posaient : dans ces types de vin, subissant les traitements qui leur sont habituels, la fermentation malolactique est-elle un phénomène normal, habituel ? La forte diminution d'acidité qu'elle engendre conduit-elle à une amélioration de la qualité comme dans le cas des grands vins rouges ?

En dehors de l'influence du pH qui est bien connue et qui explique que les vins de certains cépages subissent cette transformation plus facilement que d'autres, nous avons étudié plus spécialement l'influence de l'oxygène qui n'est pas celle que l'on croit généralement : la présence ou l'absence d'oxygène dissous dans un vin ne modifie pas sensiblement le développement des bactéries et la vitesse de la fermentation ; bien plus l'anaérobiose absolue, réalisée dès l'ensemencement, la rend beaucoup plus difficile, contrairement aux idées anciennes.

La fermentation malolactique peut se produire bien avant le terme de la fermentation alcoolique du sucre, sans que ce sucre soit nécessairement attaqué par les bactéries.

Une addition notable d'acide sulfureux empêche la fermentation malolactique, qui est un phénomène général et normal dans le cas des vins issus de vendanges non botrytisées ou faiblement botrytisées. Nous donnons à ce sujet un certain nombre d'observations effectuées dans les conditions du laboratoire ou dans celles de la pratique courante. Dans de tels vins, comme dans les vins rouges, cette transformation est, par l'assouplissement qu'elle engendre, un facteur de qualité : elle donne au vin du moelleux, de la souplesse, l'apparence d'être légèrement sucré, même s'il ne renferme plus de sucre, avec ce grand avantage que le vin n'exige pas de doses notables d'acide sulfureux pour sa conservation.

Par contre, dans le cas des vins blancs issus de vendanges fortement botrytisées, il n'est généralement pas possible, même sans addition notable d'acide sulfureux, d'obtenir une diminution d'acidité par fermentation malolactique ; et d'ailleurs celle-ci ne serait généralement pas un élément de qualité. Ici un facteur essentiel de la qualité, l'obtention d'une acidité suffisamment faible, est lié à l'activité du *Botrytis*, c'est-à-dire aux phénomènes que nous avons étudiés dans le chapitre précédent.

Bien entendu il existe tous les types intermédiaires pour lesquels la fermentation malolactique peut être plus ou moins utile ou nuisible, plus ou moins facile ou difficile, et qu'il appartient à l'œnologue de juger dans chaque cas particulier.

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE PREMIER

- (1) PEYNAUD (E.). — *Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins*. Thèse Ing.-Docteur, Bordeaux, 1946.
- (2) GIRARD (A.) et LINDET (L.). — *Revue de Vitic.*, 1895, **4**, 317 ; 1896, **6**, 173 ; 1898, **9**, 736.
- (3) GENEVOIS (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936, **18**, 295.
- (4) GENEVOIS (L.), PEYNAUD (E.), et RIBÉREAU-GAYON (J.). — *C. R. Acad. Sci.* 1946, **223**, 693 ; 1947, **224**, 762 ; 1948, **226**, 439 ; 1949, **229**, 479 ; 1948, **227**, 227 ; 1949, **229**, 777.
- (5) FERRÉ (L.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1928, **21**, 75.
- (6) RIBÉREAU-GAYON (J.). — *Bull. Ass. Chim.* 1938, **55**, 601. *Ann. Ferment.* 1941, **6**, 228 ; 1942, **7**, 21.
- (7) RIBÉREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *Analyse et contrôle des vins*, Béranger, éd., Paris, 1948.
- (8) GENEVOIS (L.) et RIBÉREAU-GAYON (J.). — *Le vin*, Hermann et Cie, éd., Paris, 1947.
- (9) GILLE (R.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1932, **25**, 146.
- (10) JAULMES (P.). — *Analyse des vins*, Poulain, éd., Montpellier, 1951.
- (11) PEYNAUD (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1939, **32**, 228.
- (12) DENIGÈS (G.), CHELLE (L.) et LABAT (A.). — *Précis de Chimie analytique*, Maloine, éd., Paris, 1930.
- (13) PEYNAUD (E.). — *Ann. Falsif.* 1936, **29**, 260.
- (14) PEYNAUD (E.). — *Bull. Inter. Vin.*, 1938, **118**, 33.
- (15) PEYNAUD (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1938, **31**, 332.
- (16) PEYNAUD (E.) et CHARPENTIE (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1950, **43**, 246.
- (17) PEYNAUD (E.) et CHARPENTIE (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1954, 47.
- (18) OURNAC (A.). — *Ann. Techn. Agric.* 1953, **2**, 137.
- (19) PEYNAUD (E.) et CHARPENTIE (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1953, **46**, 14.
- (20) FLEURY (P.) et LANGE (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1932, **191**, 1395.

CHAPITRE II

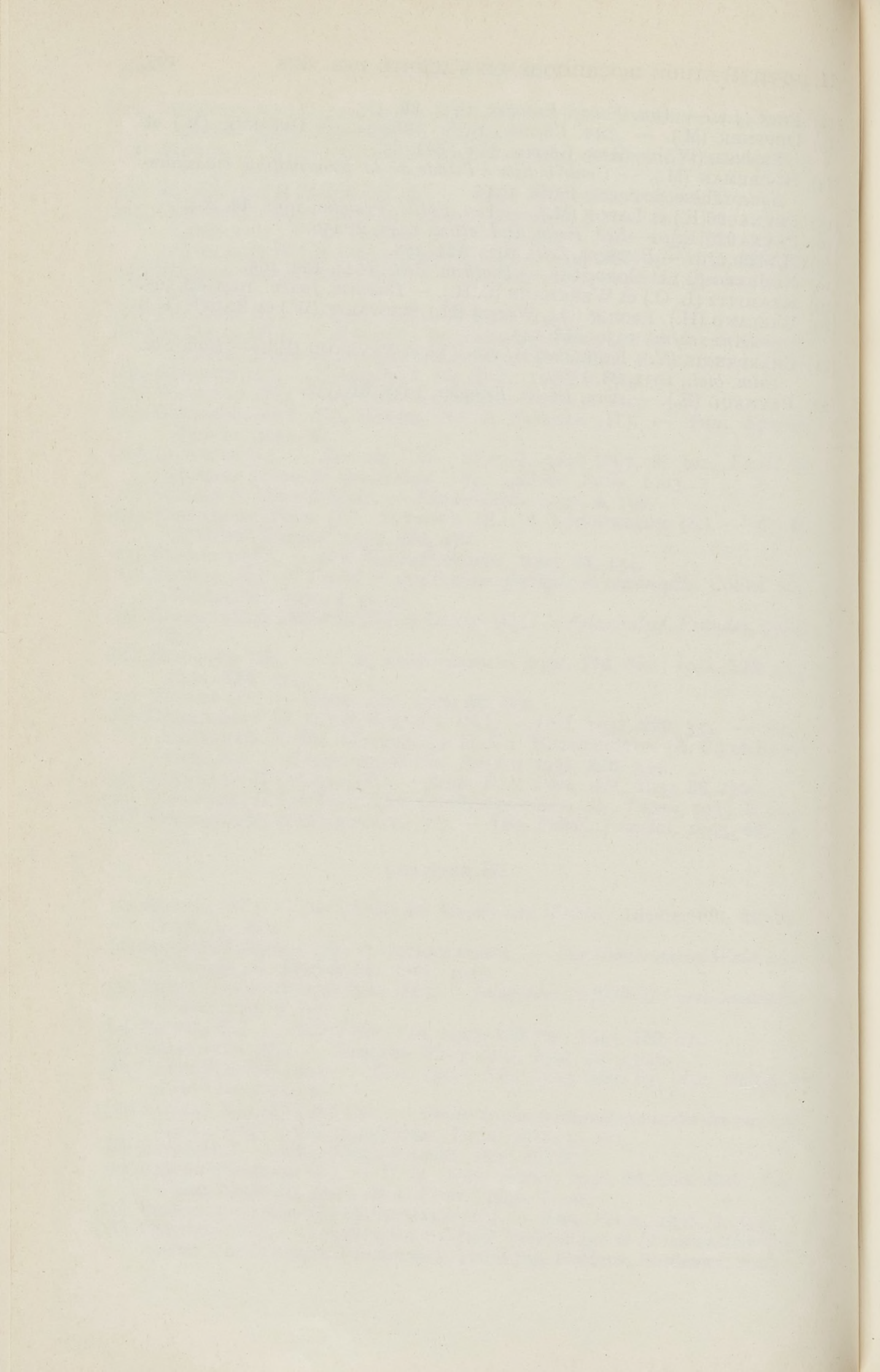
- (1) RIBÉREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *C. R. Académie Agriculture*, 1938, **24**, 535. — MICHEL (A.), *Vignes et Vins*, 1949, **6**, 23.
- (2) LABORDE (J.). — *Cours d'œnologie*, Féret édit., Bordeaux, 1907.
- (4) VON DER HEIDE (C.) et SCHMITTHENNER (F.). — *Der Wein*, Vieweg éd., Brunswick, 1922, p. 39.
- (4) GUILLON (J. M.). — *Revue Viticulture*, 1906, **26**, 117. — LAFON (R.) et LAFON (J.). — *La pourriture des raisins en Charente*.
- (5) RAVAZ (L.) et GOUIRAND (G.). — *Revue Viticulture*, 1896, **6**, 101. — GUILLON (J. N.) et GOUIRAND (G.). — *Revue Viticulture*, 1899, 12. — PEYNAUD (E.) et LAFON (J.). — *Vignes et Vins*, 1953, **24**, 12.
- (6) NEUBAUER (C.). — *Landwirt. Versuchstationen*, 1869, **11**, 416.
- (7) MÜLLER-THURGAU (H.). — *Die Edelfäule der Trauben*, *Landwirt. Jahrbücher*, 1888, **17**, 83.
- (8) MARCHAL (E.), MANIL (P.) et VANDERWALLE (R.). — *Éléments de pathologie végétale*. Duculot éd., Genève, 1937, p. 159.
- (9) HANSEN (H. N.) et SMITH (R. E.). — *Phytopathology*, 1932, **22**, 953.
- (10) BARNES. — *Ann. Botanique*, 1930, **44**, 825.

- (11) PESANTE (A.). — *Ann. Accad. Agric. Torino*, 1947 (*In Ann. Staz. enologia sperim. Asti.*, 1937, **19**, 52, p. 23).
- (12) FOSTER (J. W.). — *Chemical activities of fungi*, Academic Press éd., New-York, 1949.
- (13) RIPPEL (A.) et HEILMANN (I.). — *Arch. Mikrobiol.*, 1930, **1**, 119.
- (14) CHRZASZCZ (T.) et LÉONARD (K.). — *Biochem. Journ.* 1936, **30**, 1233. — CHRZASZCZ (T.) et TIUKOW (D.). — *Biochem. Zeits*, 1930, **229**, 343. — CHRZASZCZ (T.) et ZAKOMORNY (M.), *Ibid.*, 1936, **285**, 340; 1936, **285**, 348.
- (15) TOMBESI (L.) et FORTINI (S.). — *Stazione chimico-agraria sperim. Rome*, 1950.
- (16) PEYNAUD (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1952, **45**, 11.
- (16 bis) COLIN (H.). — *Hydrolyse de quelques polysaccharides par le Botrytis cinerea*. Thèse de Doctorat de Sciences naturelles, Paris, 1911.
- (17) BEHRENS (J.). — *Centralblatt. für Bakt.*, 1898, **4**, 514.
- (18) WINDISCH (K.). — *Berichte Geisenheim*, 1903, p. 142.
- (19) GARINO-CANINA (E.), CAPRIS (N.) et PASSERA (U.). — *Ann. Sperim. Agraria*, 1951, **5**.
- (20) LABORDE (J.). — *Rev. de Vitic.* 1897, **7**, 524; 1897, **8**, 301. *Etude de quelques points de vinification*. Imp. Lahure, Paris, 1903.
- (21) SCHOEN et EKREM ERAS. — *Enzymologia*, 1937, **4**, 198.
- (22) RIBÉREAU-GAYON (J.), PEYNAUD (E.) et LAFOURCADE (S.). — *C. R. Académie Sciences*, 1952, **234**, 478.
- (23) BEHRENS (J.). — *Arb. Gesundheitsamte*, 1905, **23**, 134.
- (24) VENTRE (J.). — *Traité de vinification pratique et rationnelle*. Coulet éd., Montpellier, 1929, **1**, p. 44.
- (25) BLAREZ (Ch.), DENIGÈS (G.) et GAYON (U.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1914, **7**, 9.
- (26) MOLLIARD (M.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1922, **174**, 881; 1924, **178**, 41; 1924, **178**, 161.
- (27) MÜLLER (D.). — *Chem. Zeit.* 1926, **50**, 101.
- (28) BIRKENSHAW (J. H.) et RAISTICK (H.). — *Ibid.* 1931, **220**, 331. — BIRKENSHAW (J. H.), CHARLES (J. H. V.), HETERINGTON (A. C.) et RAISTICK (H.). — *Trans. Royal Soc. London* 1931, **220**, 355.
- (29) TAKAHASHI (T.) et ASAÏ (T.). — *Zentr. Bakt. Para. Abt.*, 1933, **88**, 276.
- (30) TAKAHASHI (T.) et ASAÏ (T.). — *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1933, **9**, 443.
- (31) PEYNAUD (E.) et CHARPENTIÉ (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1953, **46**, 14.

CHAPITRE III

- (1) SEIFERT (W.). — *Die Chemie des Mostes und Weines*. Diemer éd., Mainz, 1938, p. 210.
- (2) MÜLLER-THURGAU (H.) et OSTERWALDER. — *Die Bakterien im Wein und Obstwein*. G. Fischer éd., Iéna, 1913.
- (3) LÜTHI (H.) et RENTSCHLER (H.). — *Jahresbericht 1949-51 Versuchsanstalt Wädenswill*, p. 631.
- (4) RIPPEL (K.). — *Bull. Inter. Vin*, 1943, **155**, 89; 1943, **159**, 87.
- (5) SCHANDERL (H.). — *Deutsche Wein Zeit.*, 1943, n° 43-46.
- (6) GARINO-CANINA (E.). — *Bull. Inter. Vin*, 1943, **159**, 63. *Acc. italiana Vite Vino*, 1952, **4**.
- (7) MOREAU (L.) et VINET (E.). — *Guide de vinification rationnelle des raisins blancs*. Imp. Sciences agricoles, Paris, 1928, p. 171.
- (8) FERRÉ (L.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1928, **21**, 67.
- (9) RIBÉREAU-GAYON (J.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1938, **24**, 600. *Bull. Ass. Chim.*, 1938, **55**, 601; *Ann. Ferm.*, 1942, **7**, 21.
- (10) RIBÉREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *Ann. Ferm.*, 1938, **4**, 559.
- (11) PEYNAUD (E.). — *Contribution à l'étude biochimique de la maturation des raisins et de la composition des vins*. Thèse Ing. Docteur, Bordeaux, 1946.

- (12) PIEN (J.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1937, **30**, 473.
 - (13) DEFFNER (M.). — *Ann. Chemie*, 1938, **535**, 44. — DEFFNER (M.) et FRANKE (W.). — *Ann. Chemie*, 1939, **541**, 85.
 - (14) HOOREMAN (M.). — *Contribution à l'étude de la fermentation butanedio-lique*. Thèse Sciences, Paris, 1948.
 - (15) PEYNAUD (E.) et LAFON (M.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1951, **44**, 264.
 - (16) PEYNAUD (E.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, 1947, **2**, 150.
 - (17) HIRSCH (J.). — *Biochem. Zeit.*, 1922, **131**, 178.
 - (18) NEUBERG (C.) et GORR (G.). — *Biochem. Zeit.*, 1924, **154**, 495.
 - (19) KRAMPITZ (L. O.) et WERKMANN (C. H.). — *Biochem. Journ.*, 1941, **35**, 595.
 - (20) WIELAND (H.), PROBST (O.), WALCH (H.), SCHWARZE (W.) et RAUCH (K.). — *Ann. chem.*, 1939, **542**, 145.
 - (21) CHARPENTIER (Y.), RIBÉREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — *Bull. Soc. chim. biol.*, 1951, **33**, 1369.
 - (22) PEYNAUD (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1938, **31**, 332.
-



INFLUENCE DE LA NATURE DES MÉLASSES SUR L'ACTIVITÉ FERMENTAIRE DES LEVURES DE BOULANGERIE

PAR

Albert BOURDET et Léon PETIT

Laboratoire de Biochimie et Physico-chimie des Céréales, Paris

PLAN DU MÉMOIRE

- I. — **Introduction** : objet des recherches
 - II. — **Conditions expérimentales et techniques utilisées** :
 - Analyse des mélasses brutes.
 - Clarification.
 - Composition du milieu de culture.
 - Détermination de l'activité fermentaire et de la croissance des levures.
 - III. — **Résultats obtenus** :
 - A. — Composition chimique et valeur biologique des mélasses brutes.
 - B. — Valeur biologique comparée des mélasses brutes et clarifiées.
 - IV. — **Discussion des résultats.**
 - V. — **Conclusions.**
 - Bibliographie.**
-

I. — INTRODUCTION

Deux préoccupations essentielles président à la culture industrielle des levures de boulangerie : le haut rendement des récoltes et la qualité du produit obtenu. Par qualité nous entendons celles intéressant au premier chef le boulanger et le levurier : un pouvoir fermentaire élevé et constant, une conservation satisfaisante. Il arrive toutefois que l'on ait à déplorer une diminution des rendements et un amoindrissement de la qualité des levures récoltées. Les méthodes de contrôle font apparaître en effet des variations sensibles dans l'activité fermentaire et autolytique

des levures, non seulement en fonction de leur origine culturelle, mais pour une même production, en fonction des récoltes successives.

Il est rare que ces fluctuations aient pour cause la mauvaise qualité des souches employées ou des conditions de culture défectueuses, les unes et les autres étant scrupuleusement contrôlées. Il faut le plus souvent en rendre responsables les variations de composition et de qualité de la matière première essentielle du milieu de culture : les mélasses.

L'entrepôt de ces mélasses par couches successives au fur et à mesure de l'approvisionnement en rend l'homogénéisation délicate au moment de l'emploi. Leur vieillissement est d'autre part susceptible de provoquer un amoindrissement de leur qualité initiale. Enfin, leur valeur nutritionnelle peut subir des modifications plus ou moins marquées selon le mode de clarification qui est pratiqué au moment de la préparation du milieu de culture.

L'étude présentée a pour but :

1° De rechercher une relation éventuelle entre la composition chimique des mélasses et leur valeur biologique, définie par leur aptitude à favoriser la multiplication cellulaire des levures de boulangerie en anaérobiose ;

2° D'étudier l'influence d'une méthode de clarification utilisée industriellement sur cette valeur biologique.

II. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET TECHNIQUES

Analyse des mélasses brutes

Les essais ont porté sur 5 échantillons (désignés respectivement de A à E) de mélasses de betteraves d'origine différente, la mélasse A ayant seule subi un vieillissement prolongé.

Les échantillons présentaient après repos une zone inférieure dense et hétérogène de couleur foncée contenant d'importants cristaux de sucre, et une zone surnageante apparemment homogène. Les analyses ont été effectuées après dilution à 40 p. 100 de cette couche supérieure sans homogénéisation préalable.

— La substance sèche a été déterminée par dessiccation sur sable à 50°C sous vide, en présence de P_2O_5 jusqu'à poids constant.

— L'azote total par la méthode de KJELDAHL.

— Les sucres totaux après inversion, par les méthodes de BERTRAND ou de SHAFFER-HARTMANN, l'une et l'autre donnant des résultats identiques.

Le fractionnement sur échangeur de cations a été conduit selon une technique déjà exposée en détails (I) : une prise d'échantillon convenablement diluée est filtrée sur une colonne de ZEOCARB, qui est ensuite rincée abondamment ; le filtrat et les eaux de lavage réunis contiennent, entre autres, les sucres et les substances azotées de nature non aminée. La

colonne est alors traitée par une solution ammoniacale diluée : on recueille d'abord un effluent, à réaction acide puis neutre, renfermant une partie des pigments et une proportion variable, en général faible, de composés azotés autres que nitrates, nitrites ou aminoacides ; la seconde partie de l'effluent, alcaline, entraîne le reste des pigments, les aminoacides et des réducteurs, vraisemblablement du genre mélanoidine.

Clarification

La méthode de clarification utilisée est analogue à celle pratiquée industriellement par voie acide.

Chaque échantillon est dilué entre 25 et 30° BALLING ($d = 1,137$ à $1,176$) puis acidifié par SO_4H_2 jusqu'à pH 3,4. On procède à une ébullition à reflux de 30 minutes, la mélasse est alors centrifugée. Sur l'extrait clarifié recueilli on dose le sucre en pratiquant une nouvelle inversion. On a vérifié qu'au cours du traitement de clarification le saccharose n'était pas totalement hydrolysé.

Composition du milieu de culture

Sa composition dérive de celle du milieu synthétique préconisée par OLSON-JOHNSON (2) utilisable à l'échelle laboratoire et permettant des rendements élevés en levure.

Pour chaque essai, la quantité de mélasse brute ou clarifiée utilisée est telle qu'elle réalise un apport en sucre de 2 g. La prise de mélasse est additionnée de 240 mg d'azote minéral assimilable apporté sous forme de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$. La solution est ajustée au pH 4,5 par l'acide phosphorique dilué et amenée à 25 cm³.

Détermination de l'activité fermentaire

Les essais ont été conduits à $28^\circ\text{C} \pm 0,1$ à l'aide de l'appareil de mesure du CO_2 déjà décrit (3).

Chaque milieu, composé comme il vient d'être indiqué, a étéensemencé par 5 cm³ d'une suspension de la même levure contenant en substance sèche 120 mg.

Dans tous les cas la durée de fermentation a été de 8 heures.

Détermination du poids de la récolte

Sitôt la fermentation terminée, la levure est séparée de son milieu par centrifugation, lavée 3 fois à l'eau distillée et séchée à 105°C jusqu'à poids constant.

III. — RÉSULTATS OBTENUS

A. — Composition chimique et valeur biologique des mélasses brutes

Nous avons rassemblé dans le tableau I les résultats concernant les essais biologiques parallèlement à la composition chimique des mélasses totales et des diverses fractions obtenues après passage des mélasses sur colonne échangeuse de cations.

COMPOSITION CHIMIQUE

Du point de vue composition chimique globale, si les teneurs en sucre des diverses mélasses examinées sont assez voisines, il n'en est pas de même des teneurs en azote ; l'échantillon B et surtout l'échantillon E présentent un taux d'azote élevé par rapport aux 3 autres.

L'analyse des fractions séparées par échange d'ions permet de faire apparaître des différences plus marquées entre les divers échantillons. C'est ainsi que la proportion de réducteurs contenus dans l'éluat alcalin (exprimés en sucre dans nos résultats) peut varier de 0,30 à 2,25 p. 100 du sucre total.

TABLEAU I

Composition chimique et valeur biologique des mélasses brutes

Mélasses	Analyse chimique								Essais biologiques	
	Matière Sèche	Sucres			Azote				Levure formée (en mg par g de mélasse sèche)	CO ₂ dégagé en 8 h. (en cm ³ par g de mélasse sèche)
		totaux (en % de sub- stance sèche)	du filtrat (en % du sucre total)	de l'éluat alcalin	total (en % de sub- stance sèche)	du filtrat	de l'éluat			
							acide	alcalin		
	%						(en % de l'azote total)			
A	78,5	62,10	98,72	1,28	2,166	52,00	4,8	43,00	15,0	58,7
B	76,9	64,50	99,70	0,30	2,313	37,00	4,7	58,3	48,2	139,4
C	80,0	63,70	98,20	1,80	2,165	4,35	9,1	86,5	42,8	130,3
D	81,1	65,20	97,50	2,50	2,187	4,30	8,3	87,4	28,9	113,9
E	81,40	63,80	98,30	1,70	2,560	5,00	0,90	94,0	36,7	124,4

Mais surtout le fractionnement sur colonne permet de distinguer qualitativement 3 groupes de constituants azotés, dont l'un bien défini (éluat alcalin) contient la totalité de l'azote aminé des mélasses.

Les résultats quantitatifs obtenus sur chacune de ces fractions différencient nettement les mélasses entre elles. C'est ainsi que l'azote

dosé dans les filtrats, constitué vraisemblablement et pour la plus grande part d'azote minéral, représente selon les échantillons de 5 à 50 p. 100 de l'azote total.

Quant à la fraction échangeable, elle accuse elle-même des variations importantes puisqu'elle peut constituer, selon l'échantillon, de 43 à 94 p. 100 de l'azote total, la mélasse E étant à la fois la plus riche en azote total et échangeable. En outre, pour 2 échantillons de teneur en azote total identique (A et C) le pourcentage d'azote échangeable varie du simple au double (respectivement 43 et 86 p. 100).

VALEUR BIOLOGIQUE

En s'appuyant sur les relations établies antérieurement entre l'activité fermentaire des levures et leurs synthèses cellulaires au cours de la fermentation (4) il a été possible d'exprimer la valeur biologique globale des mélasses étudiées, à la fois par les quantités de levure récoltées et les volumes de CO_2 dégagés dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus. Les résultats obtenus, tout en confirmant nos observations antérieures, montrent que la même levure présente un comportement très variable selon la mélasse constituant le milieu fermentaire, et, par suite, que les divers échantillons examinés se différencient très nettement du point de vue valeur biologique. C'est ainsi, par exemple, que les 2 mélasses A et B assurent respectivement un dégagement gazeux de 59 et 140 cm^3 et la synthèse de 15 et 48,2 mg de levure.

B. — Valeur biologique comparée des mélasses brutes et clarifiées

Pour tous les échantillons examinés, la clarification se traduit par un changement de coloration de la mélasse qui vire au rouge grenat et l'apparition d'un précipité apparemment volumineux. La centrifugation permet de séparer la mélasse claire d'un résidu pondéralement peu important. Étant donné les quantités minimales recueillies aucune détermination n'a été effectuée sur le culot de centrifugation.

La valeur biologique des mélasses ainsi clarifiées a été déterminée sur les mêmes bases que précédemment ; les résultats obtenus sont consignés dans le tableau II comparativement à ceux concernant les mêmes mélasses non clarifiées.

La clarification semble ne pas modifier l'ordre de classement des mélasses en fonction de leur valeur biologique. Mais les valeurs absolues exprimant cette qualité (activité fermentaire et rendements en levure) sont en général plus faibles après clarification. Dans les conditions où nous l'avons effectuée, cette opération semble donc déterminer un léger abaissement de la valeur biologique du moins en ce qui concerne les

TABLEAU II

Valeur biologique comparée des mélasses brutes et clarifiées

Mélasses	Rendements mg de levure synthétisée par g sec de		Activité fermentaire cm ³ CO ₂ dégagés après 8 h. par g sec de	
	mélasse brute	mélasse clarifiée	mélasse brute	mélasse clarifiée
A	15,0	41,0	58,7	114,5
B	48,2	45,0	139,4	128,5
C	42,8	37,0	130,3	126,4
D	28,9	26,4	113,9	108,4
E	36,7	35,6	124,4	124,1

4 échantillons B, C, D, E. Dans le seul cas de la mélasse A, au contraire, l'activité fermentaire et les rendements en levure se trouvent plus que doublés après clarification.

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS

Parmi les constituants d'une mélasse, on peut admettre que certains exercent une action favorable au développement de la levure, alors que d'autres se comportent comme des inhibiteurs. Dans le premier groupe figurent évidemment les facteurs de croissance (vitamines et certains acides aminés) et très vraisemblablement des oligo-éléments ; dans le deuxième groupe peuvent être comptés d'autres éléments minéraux inhibant certains systèmes enzymatiques et des composés organiques du type humique dont l'action néfaste est bien connue en levurerie. En définitive déterminer la valeur biologique d'une mélasse revient à apprécier la résultante de ces deux actions.

Composition et valeur biologique

Les résultats que nous avons obtenus font apparaître pour chacune des mélasses examinées une aptitude plus ou moins grande à favoriser la multiplication cellulaire. Étant donné que les compositions des milieux étaient identiques quant à la teneur en sucre et azote minéral assimilable, que l'on avait pris soin de fixer les pH de chaque milieu à une même valeur initiale, et qu'enfin la même levure a été utilisée pour toutes les déterminations, il faut admettre que les différences observées ne peuvent être imputables qu'à l'apport particulier de chaque échantillon en constituants accélérateurs et inhibiteurs du développement de la levure.

Parmi les constituants utiles, l'étude analytique effectuée dans les conditions énoncées envisage surtout l'azote organique apporté par

chaque mélasse, l'azote échangeable dosé dans la fraction alcaline de l'effluent comprenant en effet la totalité de l'azote aminé. Or aucun parallélisme ne se manifeste de façon constante entre la richesse en azote échangeable et l'importance des synthèses cellulaires en anaérobiose : la mélasse A, ayant 43 p. 100 de son azote sous cette forme, assure la formation de 15 mg de levure ; la mélasse B, dont l'azote échangeable représente 58 p. 100 du total, conduit bien à un rendement de 48 mg, mais un troisième échantillon (E), pour lequel cette même forme d'azote constitue 94 p. 100 du total, permet la formation de 37 mg de levure seulement. Dans ce dernier cas, on observe donc un rendement en levure plus faible qu'avec la mélasse B où pourtant la teneur en azote échangeable se trouve inférieure.

Il ne semble donc guère possible d'attribuer à l'azote organique des mélasses dans son ensemble le rôle prédominant favorable à la multiplication des levures qui avait été envisagé au début de ce travail. Puisque les recherches qualitatives sur la composition en acides aminés des mélasses n'ont pas permis de mettre en évidence des différences marquées entre divers échantillons (1), il serait peut-être profitable d'entreprendre une étude quantitative de ces amino-acides dans les mélasses, en particulier de ceux dont l'importance pour la croissance de *S. CEREVISIAE* a été signalée (5-6-7).

Il paraît vraisemblable d'autre part que les différences de valeur biologique constatées aient pour cause principale l'apport variable de chaque échantillon en facteurs de croissance, vitamines et oligo-éléments ; on a en effet signalé des différences sensibles quant à la teneur en biotine de mélasses d'origines diverses (8). Il y aurait donc lieu de pousser aussi dans ce sens l'étude analytique des mélasses.

La recherche systématique des constituants susceptibles d'inhiber la croissance des levures n'avait pas été envisagée initialement. Cependant, la comparaison entre valeur biologique et proportion de réducteurs non-sucres suggère l'hypothèse d'un rôle possible d'inhibiteurs joué par ces composés, sans doute apparentés aux mélanoïdines. On peut noter en effet que l'échantillon B pour lequel ils représentent la plus faible proportion par rapport au réducteur total (0,30 p. 100), est précisément celui qui assure la meilleure valeur biologique (48 mg,2 de levure) ; de même, à l'exception d'un échantillon (A) qui se singularise par son comportement à la clarification, c'est l'échantillon D qui a en même temps la plus forte proportion de ces réducteurs et la plus faible valeur biologique. Enfin les échantillons C et E occupent une position intermédiaire par rapport aux précédents, aussi bien par leur valeur biologique que par leur teneur en réducteur non sucre.

Influence de la clarification

La clarification des mélasses au stade industriel a pour but d'éliminer certaines « impuretés » nuisibles à la qualité des levures et au rendement des récoltes. Bien que leur nature demeure encore très mal définie, ces impuretés semblent constituées entre autres par des gommages et des matières colorantes d'origines diverses : produits de dégradation des sucres, mélanoidines, substances humiques, dérivés oxydés des phénols (9). En levurerie la clarification s'effectue le plus souvent à chaud, par voie acide, et c'est le principe de cette méthode qui a été retenu pour nos essais.

Telle qu'elle a été pratiquée dans nos conditions expérimentales, la clarification semble entraîner une légère baisse de la valeur biologique des mélasses brutes, du moins pour quatre des échantillons examinés. Il y aurait là l'indice que l'opération a eu pour effet principal un appauvrissement de la mélasse en constituants exerçant une influence favorable sur la multiplication cellulaire. Il semble peu probable d'ailleurs que la valeur biologique des composés organiques azotés ait été amoindrie par la clarification, car l'action d'un acide à chaud doit plutôt provoquer éventuellement une certaine hydrolyse des constituants azotés de nature peptidique en molécules élémentaires d'acides aminés plus facilement assimilables. Il faut plutôt admettre que le traitement subi par la mélasse a entraîné la destruction partielle de quelques facteurs vitaminiques thermolabiles même en milieu acide.

Les constatations sont totalement opposées dans le cas de l'échantillon A. Avant clarification, cette mélasse avait fourni un poids de levure notablement plus faible que les 4 autres ; or après clarification, le volume de CO_2 dégagé passe de 58,7 à 114,5 cm^3 et le poids de levure synthétisée de 15 à 41 mg, ce qui correspond à une valeur biologique plus que doublée. Ce comportement vraiment singulier conduit à penser que la clarification a éliminé certains composés fortement inhibiteurs présents dans la mélasse brute. Une telle hypothèse semble d'autant plus vraisemblable que, des 5 échantillons examinés, A était le seul à avoir subi un vieillissement important, et par suite, vraisemblablement le plus riche en matières « humiques » nuisibles.

En apparence opposés, les résultats obtenus avec la mélasse A d'une part, les mélasses B, C, D, E d'autre part, deviennent cohérents si on admet que dans le premier cas la clarification a éliminé davantage de facteurs nuisibles qu'elle n'a détruit de facteurs utiles, et que, dans les autres cas, l'amoindrissement des facteurs utiles l'a emporté sur l'élimination des facteurs nuisibles, les phénomènes observés n'étant que la résultante de ces actions contraires.

Ces faits montrent l'intérêt que doit présenter, pour des recherches

à venir, l'étude du résidu éliminé au cours de la clarification, tant du point de vue de sa composition chimique que de l'influence inhibitrice qu'il est à même d'exercer sur la multiplication des cellules de levure. Il serait également utile de préciser dans quel sens les diverses méthodes de clarification utilisées industriellement sont susceptibles d'améliorer ou d'amoindrir la valeur biologique des mélasses brutes et de déterminer la nature des modifications éventuellement constatées.

V. — CONCLUSIONS

En montrant que des mélasses d'origine et de composition différentes étaient capables de modifier de façon importante l'activité fermentaire d'une même levure et son aptitude à la multiplication, l'étude qui vient d'être présentée a mis en évidence toute l'importance que l'on doit attacher au stade industriel à la nature des mélasses entrant dans la composition du milieu de culture des levures de boulangerie.

La méthode de détermination de l'activité fermentaire pratiquée dans nos essais offre un moyen simple d'évaluer de façon globale la valeur biologique d'une mélasse. Appliquée de façon systématique à de nombreux échantillons, elle devrait permettre à l'industriel d'apprécier la qualité des mélasses qu'il se propose d'utiliser.

Parmi les divers constituants des mélasses susceptibles d'activer la croissance de la levure, il n'apparaît pas que les composés azotés organiques aient quantitativement une importance prépondérante. Tout en envisageant une étude qualitative et quantitative plus poussée sur la composition des mélasses en acides aminés, on se propose d'orienter plus particulièrement les recherches à venir vers la composition des diverses mélasses en facteurs vitaminiques et oligo-éléments.

Le rôle éventuel des constituants de la mélasse nuisibles à la levure ne doit pas être négligé ; et, en ce sens, il y aura lieu de préciser, parmi les diverses méthodes de clarification pratiquées industriellement, celles permettant d'éliminer au mieux ces constituants défavorables tout en conservant au maximum les facteurs favorables.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) PETIT (L.) et GUILLEMET (R.). — Comportement des mélasses de betterave sur un échangeur de cations. *Ann. Techn. Agr., I. N. R. A.*, **1**, n° 1, p. 161, 1952.
- (2) OLSON (B. H.) et JOHNSON (M. J.). — Factors producing high yeast yields in synthetic media. *J. Bacter.*, **57**, n° 2, p. 235, 1949.
- (3) BOURDET (A.). — Etude et mesure du pouvoir fermentaire des levures hautes pressées de boulangerie en fonction de la présence de divers éléments nécessaires à leur activité ou susceptibles de l'accroître. *Ind. Agr. Alim.*, **66**, n° 11-12, p. 531, 1949.

- (4) BOURDET (A.) et GUILLEMET (R.). — L'activité fermentaire des levures de boulangerie en relation avec leurs synthèses cellulaires au cours de la fermentation. *Ann. Techn. Agr.*, I. N. R. A., **1**, n° 1, p. 65, 1952.
 - (5) NIELSEN (N.) et HARTELIUS (V.). — Investigations on the joint action of aneurin and beta alanine as yeast growth substances in combination with asparagin and glutamic acid. C. R. Trav. Lab. Carlsberg, ser. Physiol., **22**, n° 23, p. 375, 1939.
 - (6) MITCHELL (H. K.) et WILLIAMS (R. J.). — The importance of amino-acids as yeast nutrients. *Biochem. J.*, **34**, n° 12, p. 1532, 1940.
 - (7) SCHULTZ (A. S.) et POMPER (S.). — Amino-acids as nitrogen source for growth of yeasts. *Arch. Biochem.*, **19**, n° 2, p. 184, 1948.
 - (8) MENZINSKY (G.). — On factors influencing the metabolism and growth of *S. Cerevisiae* (top yeast) under aerobic conditions. *Arkiv. for Kemi*, **2**, n° 1, p. 1, 1950.
 - (9) TULLIN (V.). — La formation de la couleur à différents stades de la fabrication du sucre. *Sucr. Fr.*, **92**, n° 2, p. 35. 1951.
-

L'ÉLIMINATION DU CUIVRE DANS LES EAUX-DE-VIE PAR LES PHYTATES DE CALCIUM ET DE SODIUM

PAR

R. CORDONNIER

Laboratoire de recherches de la Chaire de Technologie
(Œnologie et Industries Agricoles)
de l'École Nationale d'Agriculture de Montpellier,
Centre de Recherches Agronomiques du Midi.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Les facteurs de précipitation du cuivre.

- A. — La teneur en alcool du milieu et la nature du phytate.
- B. — L'acidité réelle.
- C. — La teneur en cuivre.
- D. — Le mode opératoire adopté pour le traitement.

III. — Traitements pratiques de quelques eaux-de-vie.

IV. — Conclusion générale.

V. — Bibliographie.

INTRODUCTION

Les eaux-de-vie contiennent normalement peu de cuivre : quelques milligrammes par litre, lorsqu'elles sortent de l'alambic, qui précipitent d'ailleurs en partie au début de leur conservation en fut ; le taux en cuivre s'abaisse alors à quelques fractions de milligrammes (1).

A ces doses, ce métal n'est ni gênant ni toxique, mais il est cependant parfois obligatoire de l'éliminer dans les alcools enrichis accidentellement au cours d'une manipulation ou destinés à l'expédition dans des pays dont la législation est particulièrement difficile à cet égard.

Cette élimination du cuivre dans les eaux-de-vie est un problème délicat, car il est indispensable de ne modifier en rien leur constitution chimique ainsi que les éléments de leur bouquet.

Il suffirait, si l'on n'avait pas à se préoccuper de la qualité, d'amener, avec de la chaux par exemple, leur acidité réelle au pH 7,1 où le cuivre précipite totalement (2).

J. LAFON et P. COUILLAUD (3) ont obtenu de bons résultats en traitant un Cognac contenant 6 mg de cuivre par litre, avec 200 g/hl d'un charbon échangeur d'ions, ce traitement étant suivi d'un collage au lait écrémé (400 à 800 cc/hl). Ces deux auteurs, dans leur publication, signalent en outre qu'aucun autre procédé ne leur a donné satisfaction.

Aussi nous a-t-il paru intéressant de rechercher à cet égard les possibilités des phytates de calcium et de sodium dont nous avons déjà étudié l'un d'eux en vue d'éliminer le fer des vins (4-5). Nous avons constaté, comme l'ont également signalé RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (6) que le phytate de calcium n'avait, en ce qui concerne le cuivre, pas d'action nette dans ces liquides. Le travail suivant permet de comprendre pour quelles raisons (c'est une question de degré alcoolique et de pH).

Dans une première partie de cette étude, faite sous la direction de M. le Professeur NÈGRE (7) nous envisageons les différents facteurs conditionnant l'efficacité du phytate et dans une deuxième partie les traitements pratiques de quelques eaux-de-vie, ce qui nous permettra de conclure.

II. — LES FACTEURS DE PRÉCIPITATION DU CUIVRE

Tous les essais de la première partie ont été faits à partir d'alcool à 96° que nous avons amené aux titres et pH voulus par addition d'eau bidistillée et d'acide acétique, le cuivre étant ajouté sous forme de Cl_2Cu .

Les traitements au phytate de calcium ont été réalisés à partir de solutions à 0,5 % dans l'acide lactique à 1 % ; ce sel est en effet insoluble dans l'eau.

Nous avons opéré de même avec le phytate de sodium bien qu'il soit soluble dans l'eau, afin de ne pas modifier les conditions expérimentales, car le phytate de sodium mis à notre disposition a une alcalinité de 2,72 milliéquivalent par gramme de produit.

Dans les traitements combinés (phytate de sodium, calcium), le calcium a été ajouté à l'alcool, sous forme d'acétate de calcium, avant l'introduction du réactif précipitant et en quantité égale à celle contenue dans le phytate de calcium mis en œuvre dans l'essai au phytate de Ca correspondant. Ainsi, le phytate de calcium ayant une teneur en calcium de 14 %, dans un traitement combiné (PhyNa + Ca) on ajoutera à l'eau-de-vie 14 mg de Ca par 100 mg de PhyNa + CNa, ce qui correspond approximativement aux conditions souhaitées.

Les traitements combinés (phytate de Na neutralisé + Ca) ont été réalisés à partir de solution à 0,5 % de phytate de Na dans l'eau, dont l'alcalinité était neutralisée par de l'acide acétique.

Enfin les essais de la deuxième partie ont été faits à partir d'eaux-de-vie normales dans certaines desquelles nous avons ajouté cependant du cuivre pour arriver au taux désiré.

Pour ce qui est du dosage du cuivre, nous avons adopté une méthode colorimétrique au réactif DELEPINE comme l'ont indiqué LAFON et COUILLAUD, mais avec quelques variantes.

La coloration jaune donnée par l'ion Cu^{++} est rassemblée dans un certain volume d'acétate d'amyle et comparée, après avoir séparé le liquide coloré de l'alcool sous jacent, à une gamme étalon. Pour obtenir un liquide parfaitement limpide il suffit de l'agiter en présence d'un peu de sulfate de soude anhydre.

A. — La teneur en alcool du milieu et la nature du phytate

Quatre alcools à 85°, 65°, 45° et 25° ayant un pH de 5,5 et une teneur en cuivre de 5 mg par litre ont été collés à raison de 50 mg de phytate de calcium par litre (essai I), 50 mg de phytate de sodium (essai II) ; et de 50 mg de phytate de sodium par litre, après avoir ajouté à l'alcool, sous forme d'acétate de calcium, une quantité de calcium égale à celle contenue dans le phytate de calcium mis en œuvre dans l'essai I, soit 14 % (essai III).

TABLEAU I

Cuivre résiduel en mg/l après traitement et proportion de cuivre éliminé

	Alcools : Cu 5 mg /l pH = 5,5							
	85°		65°		45°		25°	
	Cu résiduel	% Cu éliminé	Cu résiduel	% Cu éliminé	Cu résiduel	% Cu éliminé	Cu résiduel	% Cu éliminé
Essai I, traitement à 50 mg/l de phytate de Ca	1 mg 5	70 %	1 mg 1	78 %	4 mg 5	10 %	5 mg	0
Essai II, traitement à 50 mg/l de PhNa	0 mg 8	84 %	5 mg	0 %	5 mg	0	5 mg	0
Essai III, traitement à 50 mg/l de PhNa + Ca	0 mg 5	90 %	1 mg	80 %	4 mg	20 %	5 mg	0

Les résultats consignés dans le tableau I mettent en évidence :

1° L'INFLUENCE DU DEGRÉ ALCOLIQUE

Dans l'ensemble le cuivre paraît être d'autant mieux éliminé que le milieu est plus riche en alcool. Le pourcentage de cuivre éliminé dans les conditions de l'expérience (dose de phytate et richesse en cuivre de l'alcool) est de

o % dans l'alcool à 25°			
10 à 20 %	—	—	45°
78 à 80 %	—	—	65°
70 à 90 %	—	—	85°

Notons cependant que, dans le cas du collage au phytate de Ca le titre alcoolique optimum semble se situer autour de 65°. Nous en donnerons plus loin une explication.

Enfin, dans le cas de l'alcool à 45°, un traitement à 100 mg de PhCa, a permis d'éliminer 70 % de cuivre.

2° L'INFLUENCE DE LA NATURE DU PHYTATE

a) *Le phytate de sodium, à la dose considérée, est inefficace dès 65°* alors que le phytate de calcium élimine encore 78 % du cuivre et que le mélange (PhNa + Ca) en élimine 80 %. Tout se passe donc comme si la combinaison acide phytique et cuivre n'était pas la même dans l'un et l'autre collage.

— Dans le cas du collage au phytate de sodium il se formerait un sel peu soluble dans l'alcool à 85°, mais dont la solubilité augmente rapidement dès que le titre de l'alcool diminue.

— Dans le cas du collage au PhCa ou au mélange (PhNa + Ca) il se formerait un sel vraisemblablement un phytate double de Ca et de Cu, beaucoup moins soluble que le phytate de cuivre du collage au phytate de soude.

De plus cette combinaison phytate de calcium-cuivre précipite très rapidement et assure une clarification parfaite de l'alcool alors que dans le cas du collage au phytate de sodium seul, le trouble formé ne précipite que très lentement. Il suffit d'ailleurs de rajouter du calcium avant le traitement au phytate de soude pour obtenir une élimination du cuivre voisine sinon supérieure à celle obtenue par le phytate de calcium seul (voir tableau I, essai III).

Il se pourrait également que dans l'un et l'autre collage il se forme le même phytate de cuivre et que ce soit le cation Ca^{++} qui joue le rôle de flocculant vis-à-vis de micelles plus ou moins complexes formées d'un ensemble de molécules de phytate de cuivre. Hypothèse moins vraisemblable cependant que la précédente, car l'addition d'acétate de Ca à des alcools de fort degré, troublés par la formation de Phytate de cuivre, ne facilite pas leur clarification.

Quoi qu'il en soit, dès 65° le phytate de sodium est totalement inefficace alors que le phytate de calcium ou le mélange (PhNa + Ca) sont encore très efficaces.

b) *Le phytate de calcium est beaucoup moins soluble dans les alcools que le phytate de sodium* ce qui explique :

1° Qu'il est très inférieur au phytate de sodium dans les alcools à 85° bien que la combinaison PhCa, Cu soit plus insoluble que la combinaison PhNa, Cu.

2° Que le traitement combiné (PhNa, Ca) est dans tous les cas supérieur au traitement PhCa seul.

Le phytate de calcium présente donc deux propriétés antagonistes : il forme d'une part, avec le cuivre, *une combinaison très peu soluble*, d'où son efficacité dans les alcools à 65° et 45°, mais il *est lui-même, d'autre part, très peu soluble*, d'autant moins que le degré alcoolique est plus élevé, ce qui limite son efficacité dans les alcools forts ⁽¹⁾.

Ainsi l'élimination du cuivre est liée :

1° *A la teneur en alcool du milieu.* — L'alcool est un facteur d'insolubilisation de la combinaison du cuivre avec le phytate considéré : Le produit de solubilité du phytate de calcium, cuivre :

$$[\text{Ph}] \cdot [\text{Ca}] \cdot [\text{Cu}] = k [\text{PhCa}, \text{Cu}] = s \quad (2)$$

augmente donc quand le degré alcoolique diminue, aussi faudra-t-il d'avantage d'anion phytique, c'est-à-dire de phytate, dans les alcools de faible degré que dans les alcools plus forts, pour éliminer la même quantité de cuivre. Dans la pratique, comme nous le verrons, il faut encore augmenter d'avantage la dose de phytate de calcium parce qu'une proportion élevée de ce corps précipite sans exercer d'effet.

2° *A la nature du phytate.* — Le PhyNa est rapidement inefficace (dès 65°) car la solubilité de la combinaison PhyNa, Cu augmente rapidement quand le titre alcoolique diminue.

Le PhyCa forme avec le Cu une combinaison PhyCa, Cu beaucoup moins soluble que la combinaison du phytate de sodium, il est donc efficace même dans les alcools à 45° et 65°, cependant étant lui-même très insoluble, son efficacité est limitée dans les milieux très riches en alcool (85°).

Le traitement combiné phytate de soude, calcium permet d'utiliser à la fois la solubilité du PhyNa et l'insolubilité de la combinaison PhCa, Cu. Mais dans une certaine mesure seulement, car il faut tenir compte de la formation du phytate de calcium.

B. — L'acidité du milieu

Dans les solutions aqueuses d'acides, la solubilité du phytate de cuivre augmente rapidement avec la concentration en acides. Mais dans les solutions hydroalcooliques, l'alcool est, nous l'avons vu, un facteur d'insolubilisation du phytate de cuivre ou du phytate de calcium/cuivre donc antagoniste du facteur acidité à ce point de vue et l'influence des acides se fera d'autant moins sentir que la richesse en alcool du milieu sera plus grande et inversement.

(1) Surtout si ces alcools sont riches en cuivre : ainsi le traitement d'un alcool à 85° pH = 4,7 contenant 22,5 mg de Cu par litre, à raison de 200 mg/l de phytate de calcium n'a permis d'éliminer que 55,5 % du cuivre alors que 200 mg de phytate de sodium en éliminaient 83,1 %.

(2) Constante de dissociation $k = \frac{[\text{Ph}][\text{Ca}][\text{Cu}]}{[\text{PhCa}, \text{Cu}]}$

Des alcools à 85°, 65° et 45° ont été divisés chacun d'eux en 3 lots. Ces lots amenés respectivement aux pH 5, 4 et 3,5 ont été traités à raison de 100 mg de phytate de calcium par litre.

Les résultats de ces expériences montrent que, dans :

TABLEAU II

Alcool : Cu 5 mg/l

pH	85°			65°			45°		
	5	4	3,5	5	4	3,5	5	4	3,5
Cuivre résiduel après traitement à 100 mg de phytate de calcium par litre	2 mg	1,5	1,5	1,5	1,5	1,8	1,5	2	3,5

Les alcools à 85° et 65°, entre les pH 3,5 et 5 l'élimination du cuivre par le phytate de calcium semble peu ou pas influencée par l'acidité ; mais il n'en est plus de même dans les alcools à 45° puisque dans ce cas 100 mg de phytate de calcium ont éliminé 70 % du cuivre à pH 5, 64 % du cuivre à pH 4, 30 % du cuivre à pH 3,5.

Le facteur acidité devient donc prépondérant dès que le pourcentage en alcool du milieu arrive au voisinage de 45 %.

L'expérience reprise sur deux alcools de 45 et 50° a très bien mis ceci en évidence.

TABLEAU III

PH	Alcool N° I 45° Cu 6,5 mg/l				Alcool N° II 50° Cu 5 mg/l			
	2	3	4	5	2	3	4	5
Acidité en milliéquivalent/l	86	38	7	4	88	40	8	6
Cuivre en mg après traitement à 100 mg de phytate de Ca	6 mg 5	5,5	3	2	5	2	1	0,8
% de cuivre éliminé	0	15,3 %	53,8	69,2	0	50	80	84

Pour chacun des 2 alcools, le pourcentage de cuivre éliminé est nul à pH 2, il augmente ensuite avec le pH.

Ces pourcentages sont nettement plus élevés dans l'eau-de-vie N° II de 50° que dans l'eau-de-vie N° I de 45°.

Le seuil d'efficacité du phytate de Ca à la dose de 100 mgr/l semble se situer entre les pH 2 et 3.

Notons qu'il suffit alors d'augmenter la dose de PhCa pour obtenir un résultat. Ainsi le traitement à 300 mg de PhCa des lots à pH 2 et 3 de

l'eau-de-vie N° II a fait passer le cuivre résiduel de 5 mg à 2,5 mg dans le lot à pH 2 et à 1 mg dans le lot à pH 3.

Dans les alcools à pH bas, environ 3, il faudra donc comme dans les alcools de faible degré et pour la même raison : augmentation de la solubilité du PhCaCu , augmenter la concentration en ions phytiques pour provoquer la précipitation du PhCaCu (voir p. 183) en quantité suffisante.

L'élimination du cuivre est donc non seulement fonction de la teneur en alcool du milieu, mais aussi de son acidité.

L'acidité étant un facteur de solubilisation du phytate de cuivre ou du phytate de Ca/Cu , joue en sens inverse de l'alcool, mais son influence se fait d'autant moins sentir que le titre alcoolique du milieu est plus élevé.

Pratiquement dans les alcools à 85° et 65° entre les pH 3,5 et 5, l'élimination du cuivre est peu influencée par l'acidité, mais dès que la teneur en alcool descend au voisinage de 45 % le facteur acidité devient prépondérant.

C. — Le facteur teneur en cuivre du milieu

Trois alcools de même degré : 48° et de même pH : 4,5 ayant respectivement des teneurs en cuivre de 7,5 mg, 22,5 mg et 37,5 mg par litre, ont été traités à raison de 100 mg et 600 mg de phytate de calcium d'une part et de phytate de sodium d'autre part après addition de 14 mg de calcium sous forme d'acétate de chaux pour 100 mg de PhNa .

Le tableau N° IV donne leur teneur en cuivre après traitement :

TABLEAU IV

Alcools à 48° pH 4,5.

Tableau n° IV	N° 1 Cu : 7,5 mg/l	N° 2 Cu : 22,5 mg/l	N° 3 Cu : 37,5 mg/l
Traitement au phytate de Ca 100 mg.....	2 mg 5	6 mg	12 mg
« « « 600 mg.....	2,5	5	11
Traitement au phytate de Na 100 mg.....	2,1	4,5	4,2
« « « 600 mg.....	2,1	4,5	4,2

Notons en premier lieu que le mélange (phytate de $\text{Na} + \text{Ca}$) a été, par rapport au phytate de Ca d'une efficacité d'autant plus grande que l'alcool était plus riche en cuivre. Ce qui est une confirmation de nos précédentes constatations (voir page 183 en note).

Ces résultats montrent également que la proportion de cuivre éliminé est fonction de la teneur initiale en cuivre de l'alcool : dans le cas du n° I 72,0 % et dans le cas du n° III 88,8 %.

Théoriquement les 100 mg de phytate de Ca utilisés pour l'expérience,

et qui contiennent 14 mg de calcium seraient susceptibles, si le Ca était remplacé poids pour poids par le Cu dans la molécule de phytate de Ca, *de précipiter au maximum 22 mg de Cu* (en fait moins, puisqu'une partie seulement du Ca semble remplacée par du Cu).

Pratiquement il n'en est pas ainsi puisque, suivant la richesse de l'alcool en Cu, 100 mg de phytate ont éliminé de 5 à 25 mg de cuivre.

Le précipité dans lequel est entraîné le cuivre semble donc être de composition variable suivant la richesse en cuivre de l'alcool. Voici une explication de la variabilité de constitution de ce précipité :

Lors du traitement, on introduit des ions phytiques qui, en présence des cations Cu^{++} et Ca^{++} , vont former du PhCa et du PhCaCu , sels tous deux très insolubles, et la teneur en Cu du précipité dépendra essentiellement de la solubilité de ces deux sels dans le milieu considéré et donc de leur vitesse de formation c'est-à-dire de la vitesse de réaction de l'anion phytique avec le calcium d'une part, le calcium et le cuivre d'autre part. — On sait en effet que plus un corps est insoluble, plus vite il cristallise et plus les réactions se font dans le sens de sa formation. — Dans les milieux riches en cuivre, la concentration en cuivre favorisera la précipitation du PhCaCu donc sa vitesse de formation, et il se formera par contre peu de PhCa . Le précipité sera riche en PhCaCu , pauvre en PhCa .

Une quantité donnée de phytate de calcium éliminera donc d'autant plus de cuivre que la concentration du milieu en ce métal sera élevée.

Enfin dans les 3 alcools, 100 mg de phytate ont été aussi efficaces que 600 mg. Tout se passe donc comme si la limite de solubilité du phytate, dans les alcools considérés (48° pH 4,5) étant atteinte ou dépassée à 100 mg, l'excès de phytate de Ca flocculait sans entraîner du cuivre.

Cependant, dans les alcools de pH très bas il faut, comme nous l'avons déjà vu (pages 183 et 185) augmenter considérablement la dose de phytate pour obtenir un certain résultat. Ainsi dans un alcool de 50° de pH 2,75 contenant 15 mg de cuivre 100 mg de phytate ont éliminé 30 % du cuivre et 600 mg 50 %.

Ainsi le point de saturation des alcools en phytate de Ca étant très vite atteint, l'élimination du cuivre, dans les milieux riches en ce métal, sera beaucoup plus difficile que dans les milieux pauvres.

Le traitement combiné ($\text{PhNa} + \text{Ca}$) est nettement plus efficace que le traitement au phytate de Ca ; mais, même en augmentant les doses du réactif précipitant, on n'a que des résultats partiels.

D. — Le facteur mode opératoire adopté pour le traitement

Dans tous nos essais, nous n'avons utilisé jusqu'ici, pour mettre en évidence le rôle du facteur phytate, toutes conditions restant égales par ailleurs, que des solutions de phytate de calcium ou phytate de Na dans de l'acide lactique.

Mais le phytate de Na étant soluble dans l'eau nous avons essayé, dans les traitements combinés (PhNa + Ca) le PhNa en solution dans l'eau à la même concentration, 0,5 %, que dans l'acide lactique, cette solution dans l'eau étant ou neutralisée par de l'acide acétique ou laissée alcaline (alcalinité 13,6 milli-équivalents par litre).

Nous avons donc comparé, les modes de traitement suivants :

Traitement au PhCa en solution dans l'acide lactique 1 % : PhCa.
Traitement combiné : PhNa en solution dans l'acide lactique 1 % : PhNa en solution acide + Ca.
(PhNa + Ca) PhNa en solution dans l'eau : PhNa en solution alcaline + Ca.
 PhNa en solution dans l'eau et neutralisé par l'acide acétique : PhNa en solution neutre + Ca.

sur des alcools de teneur en cuivre et de pH différents.

Les résultats de ces traitements (tableau N° V) mettent en évidence :

TABLEAU V

	Alcool 50° pH = 4 Cu = 5 mg		Alcool 45° pH = 3,05 Cu = 12 mg		Alcool 45° pH = 4,55 Cu = 16 mg		Alcool 45° pH = 3 Cu = 16 mg	
	Cu après trait.	pH après trait.	Cu après trait.	pH après trait.	Cu après trait.	pH après trait.	Cu après trait.	pH après trait.
Traitement à 100 mg phytate de Ca	0 mg 8	3,9	6 mg	3,1	10 mg	4,3	12 mg 5	3,2
Traitement combinés 100 mg PhNa + Ca :								
PhNa acide	0,8	4	4	3,2	4,5	4,25	6	3,65
PhNa alcalin	traces	5,1	1 mg	3,4				
PhNa neutre	traces	5,1	1 mg	3,4	0,5	5,5	1,5	3,8
Traitement :								
à 600 mg PhCa					10	3,7	11	3,3
600 mg PhNa acide + Ca ..					4,5	4,1	5,2	3,7
300 mg PhNa neutre + Ca..					0	5,7	0	5,3

1° La supériorité dans tous les cas des traitements combinés (PhNa + Ca) sur le traitement PhCa ; ce dernier, satisfaisant pour les alcools peu riches en cuivre, a une efficacité nettement insuffisante quelle que soit la dose utilisée dans les alcools riches en cuivre.

2° La supériorité également des traitements au phytate de sodium en solution alcaline ou neutre sur les traitements au phytate de sodium en solution acide :

Les premiers ont permis d'éliminer la quasi-totalité du cuivre même dans les alcools de pH bas et riches en cuivre, alors que les seconds n'ont été que d'une efficacité très insuffisante, quelles que soient d'ailleurs les doses de phytate utilisées.

3° L'efficacité comparable du PhNa en solution alcaline et du PhNa en solution neutre.

4° Si nous examinons l'évolution des pH : nous voyons que les traitements au phytate de Ca ou au PhNa en solution acide n'ont qu'une faible répercussion sur le pH des alcools ; par contre les traitements au PhNa en solution alcaline ou neutre l'augmentent sensiblement. Nous avons vérifié que l'acidité totale restait cependant pratiquement inchangée.

Enfin à la dose de 100 mg, le PhNa en solution alcaline a la même influence sur l'évolution du pH que PhNa en solution neutre. Il semblerait donc inutile puisqu'ils ont également la même efficacité, de neutraliser l'alcalinité du PhNa, dans le cas des traitements aux faibles doses tout au moins.

On peut dire que le phytate de Ca et le (PhNa en solution acide + Ca) sont d'une efficacité suffisante dans les alcools de faible teneur en cuivre (5 mg environ) et qu'ils ne modifient pas ou peu le pH du milieu.

Par contre dans les alcools très riches en cuivre, seuls les traitements au PhNa en solution alcaline ou neutre, combinés à une addition préalable de calcium à l'alcool, permettent d'obtenir une élimination totale du cuivre. Les traitements ont cependant l'inconvénient de modifier le pH du milieu.

Cette augmentation du pH du milieu n'explique d'ailleurs qu'en partie la supériorité du PhNa en solution aqueuse sur le PhNa en solution dans l'acide lactique à 1 %. Ainsi, dans un premier essai, la presque totalité du cuivre d'un alcool avait été enlevé par un traitement à 200 mg de PhNa en solution neutre, le pH passant alors de 3 à 5,1. Dans un deuxième essai, après avoir amené le pH du même alcool à 5,1, 200 mg de PhNa en solution acide n'ont éliminé que 66 % du cuivre.

Cette supériorité semblerait plutôt résider dans le fait que, le PhNa en solution aqueuse étant beaucoup plus ionisé qu'en solution acide (en solution acide, il donne en effet de l'acide phytique d'autant moins ionisé que le pH est plus bas), la concentration en ions phytiques est beaucoup plus grande dans le premier cas que dans le second.

III. — TRAITEMENTS PRATIQUES DE QUELQUES EAUX-DE-VIE

Il nous a paru indispensable de vérifier nos conclusions sur des *eaux-de-vie authentiques* de pH et richesse en cuivre différents dans lesquelles ce métal peut se trouver plus ou moins sous forme de combinaisons organiques le masquant au réactif précipitant et rendant ainsi son élimination plus difficile que dans les alcools de composition simple étudiés dans la première partie.

Nous envisagerons successivement le traitement des eaux-de-vie pauvres en cuivre d'une part et riches en cuivre d'autre part.

1^o Traitement des eaux-de-vie pauvres en cuivre (5 à 6 mg au plus)

Le tableau VI donne les résultats des traitements à raison de 100 mg de PhCa/l de cinq eaux-de-vie.

TABLEAU VI

Traitement par le Phytate de Calcium 100 mg/l

	Eaux-de-vie				
	N ^o I	N ^o II	N ^o III	N ^o IV	N ^o V
Alcool.....	50°	52°	70°	55°	65°
pH.....	3,05	3,8	3,85	4	4,2
Cuivre mg/l.....	4,5	6	5	5	6
» résiduel.....	2,5	0,5	0,8	0,8	1
» éliminé %.....	44,4	91,8	84	84	83,3

Dans toutes ces eaux-de-vie, sauf dans la première dont le pH était particulièrement bas, l'élimination du cuivre a été satisfaisante. Le PhCa pourrait donc suffire dans le cas des eaux-de-vie peu riches en cuivre et dont le pH n'est pas inférieur à 3. Nous retrouvons là nos conclusions relatives au facteur acidité (voir page 185). Cependant le traitement combiné (PhNa en solution neutre + Ca), à raison de 50 mg/l, des eaux-de-vie N^o IV et V nous a permis d'éliminer la quasitotalité du cuivre dans les 2 cas, mais leur pH est passé de 4 à 5,1 pour la première et de 4,2 à 5,2 pour la seconde.

De plus, nous avons noté une augmentation du poids de l'extrait, de l'ordre d'une vingtaine de mg/l de l'eau-de-vie N^o V traité à 100 mg de phytate de sodium + Ca par rapport au témoin non traité, et il est vraisemblable que cette augmentation du poids de l'extrait sera plus grande encore dans les eaux-de-vie de degré alcoolique et pH plus bas surtout si leur teneur en cuivre nécessite une plus forte dose de réactif précipitant.

Il restait enfin, point essentiel, à examiner l'influence de ces traitements sur les qualités organoleptiques des eaux-de-vie ; or, dans tous les essais de dégustation qui ont été faits, il n'a pas été trouvée de différence entre les échantillons traités et les témoins.

2^o Traitement des eaux-de-vie riches en cuivre (plus de 6 mg/l)

Les eaux-de-vie N^o VI 51° pH = 2,75 Cu : 15 mg

N^o VII 49° pH = 3,05 Cu : 12 mg

toutes deux riches en cuivre et à pH bas ; — nous nous trouvons donc dans un cas d'élimination très difficile — ont été traitées séparément à

raison de 200 mg de phytate de calcium, 200 mg de phytate de sodium en solution acide + Ca et 200 mg de phytate de sodium en solution neutre + Ca.

Le cuivre résiduel après traitement et les pourcentages de Cu éliminés étaient de :

Eau-de-vie n° VI		Eau-de-vie n° VII	
Cu résiduel	Cu éliminé %	Cu résiduel	Cu éliminé %
10 mg	33,3 %	6 mg	50 % pour le traitement au PhCa
8	46,6	4	66,6 » » au PhNa
0,5	96,6	traces	100 » » acide + Ca
			au PhNa
			neutre + Ca

Le traitement combiné au PhNa en solution acide + Ca est donc nettement supérieur au PhCa, mais nous n'avons pu en aucun cas, soit en augmentant les doses de réactif, soit en faisant plusieurs traitements successifs, obtenir une élimination suffisante.

Seul, dans le cas des eaux-de-vie riches en cuivre, le traitement PhNa en solution neutre ou alcaline + Ca permet d'éliminer la quasitotalité du cuivre se trouvant dans le milieu, mais on modifie alors sensiblement le pH sans toutefois modifier les qualités organoleptiques du produit.

IV. — CONCLUSION GÉNÉRALE

La précipitation du cuivre des eaux-de-vie par les phytates de calcium et de sodium est le résultat de phénomènes complexes :

Il semble qu'elle ne se fasse pas sous forme de phytate de cuivre, mais plutôt d'une combinaison phytate de calcium, cuivre, peut-être est-ce un phytate double mal défini ; ainsi le PhNa, s'il n'est pas associé au calcium dans le milieu à traiter, est inefficace.

Le Phytate de calcium, par contre l'est, mais entre des limites bien déterminées de pH, teneurs en alcool, et en cuivre, qui restreignent son emploi aux seules eaux-de-vie peu riches en cuivre (5 à 6 mg/l au plus) et dont le pH ne soit pas inférieur à 3 environ.

Enfin, le PhNa en solution neutre ou alcaline permet d'assurer une précipitation presque totale du cuivre, même dans les cas les plus défavorables (faible teneur en alcool, forte concentration en cuivre, pH bas), s'il trouve dans le milieu, le calcium nécessaire à la formation de la combinaison PhCa, Cu. Il offre cependant l'inconvénient d'augmenter le pH, mais ne modifie en rien, d'après nos constatations, les qualités organoleptiques du produit.

BIBLIOGRAPHIE

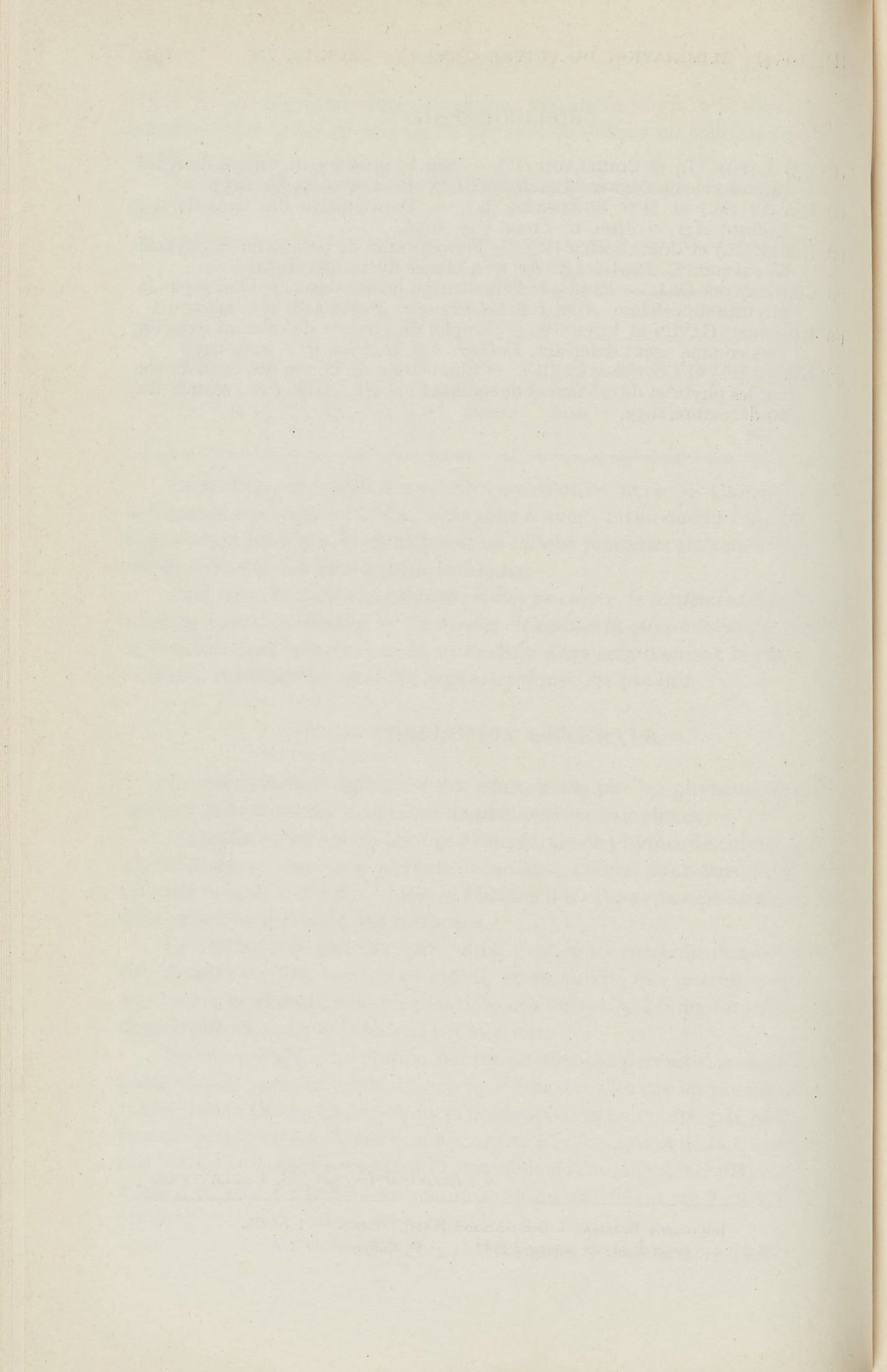
- (1 et 3) LAFON (J.) et COUILLAUD (P.). — Sur la présence du cuivre dans les eaux-de-vie de Cognac. *Annales de l'I. N. R. A.* n° 1, 41-50, 1953.
- (2) FLANZY (M.) et M^{me} BOUZIGUES (L.). — Désulfitation des eaux-de-vie. *Industr. Agr. et Alim.* n° 11-12, 593, 1051.
- (4) NÈGRE (E.) et CORDONNIER (R.). — Ferrocyanure de potassium et phytate de calcium. *C. R. Ac. Agr. Fr.* n° 9 séance du 14 mai, 1952.
- (5) CORDONNIER (R.). — Étude de l'élimination du fer des vins blancs par le phytate de calcium. *Ann. Fals. et Fraudes*, n° 527-528, 415, 1952.
- (6) RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD. — Emploi du phytate de calcium dans les vins comme agent deferrant. *Industr. Agr. et Alim.* n° 2, 129, 1953.
- (7) NÈGRE (E.) et CORDONNIER (R.). — Élimination du cuivre des eaux-de-vie par les phytates de calcium et de sodium *C. R. AC. AGR. Fce.*, séance du 16 décembre 1953.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 1-7-1954.

Dépôt légal : 3^e trimestre 1954

N° d'impression : 364



RECHERCHES CHIMIQUES SUR LA COMPOSITION DES ESSENCES SULFURÉES DES GRAINES DE COLZA ET DE NAVETTE (II)

PAR

Émile ANDRÉ et Pierre DELAVEAU

Laboratoire des Oléagineux Métropolitains de l'I. N. R. A., Bellevue.

Dans un précédent mémoire ⁽¹⁾ nous avons consigné les résultats d'une étude entreprise par nous pour établir la composition des essences sulfurées obtenues au laboratoire à partir de tourteaux de colza achetés dans le commerce. Sans doute la pureté botanique des graines dont ils provenaient n'offrait pas des garanties certaines ; des graines d'autres crucifères à huile (navette, sanve, ravenelle) avaient pu se trouver mélangées en petite proportion aux graines de colza dans les huileries où elles avaient été triturées. Par ailleurs, on cultive en France diverses variétés de colza qui peuvent fournir des essences de composition semblable mais non identique. Nous avons estimé, malgré cela, que les tourteaux de colza du commerce étaient une matière première tout indiquée pour commencer nos recherches, parce qu'on peut se les procurer en abondance, à un prix tout à fait abordable.

L'étude des essences que nous avons préparées à partir de ces tourteaux, nous a permis d'établir que l'essence de colza n'est pas constituée uniquement par du crotonylsénévol, comme cela a été souvent affirmé. Ce composé en est bien le constituant principal, mais il est accompagné de deux autres sénévols, qui sont : un angélylsénévol dont la constitution reste à établir et le phényléthylsénévol qui a été trouvé en 1899 par GADAMER ⁽²⁾ dans le cresson de fontaine ; nous avons pu établir son identité d'une façon certaine.

Ces premiers résultats acquis il convenait d'aborder l'étude particulière des essences préparées à partir de tourteaux de graines de colza de variétés pures et de rechercher : 1^o si la présence des trois sénévols trouvés dans les essences de tourteaux du commerce est constante et 2^o dans quelle

⁽¹⁾ *Annales de Technologie Agricole*, 2^e année, n^o 4, 1953, p. 243 à 263.

⁽²⁾ GADAMER. *Archiv. d. Pharm.* 1899, 237, p. 507.

mesure leur proportion peut varier lorsqu'on passe d'une variété à une autre.

Enfin, il est acquis aujourd'hui que le colza est une espèce hybrido-gène du type dit amphidiploïde ; il paraît même certain (ou très probable) que les deux espèces juxtaposées dans cet hybride particulier sont d'une part la navette (navet à huile), *Brassica rapa* L. et d'autre part un chou, *Brassica oleracea* L. Il nous a donc paru intéressant d'étudier d'assez près l'essence sulfurée de graines de navette et l'essence sulfurée des graines de chou (chou fourrager ⁽¹⁾) dans le but d'établir si les trois séné-vols rencontrés dans nos premières recherches se retrouvent dans ces deux espèces ou seulement dans l'une d'elles.

VARIÉTÉS DE COLZA ÉTUDIÉES

Il n'est pas dans notre intention de nous étendre longuement sur les variétés de colza actuellement cultivées en France. Contentons-nous de dire qu'en 1939 il existait dans notre pays d'une part des populations locales de colza ordinaire et d'autre part des populations de colza parapluie ; elles y étaient d'ailleurs fort peu cultivées et l'on ne s'était guère attaché à les améliorer tant au point de vue de leurs avantages cultureux qu'au point de vue de l'accroissement de leur productivité. Pendant la première guerre mondiale et pendant les années qui suivirent la fin des hostilités, les agronomes et généticiens des divers pays de l'Europe du Nord, Hollande, Allemagne, Suède s'attachèrent à développer la culture des oléagineux pour atténuer les souffrances imposées aux populations par la disette de corps gras. Des variétés nouvelles de colzas et de navettes, ont été créées et fixées dans des Stations de recherches agronomiques largement dotées et possédant un personnel technique de haute valeur. Ce sont : en Hollande l'Institut du Dr Mansholt à Westpolder, en Allemagne la Station d'amélioration des plantes cultivées de Giessen, dans l'ancien Grand-Duché de Hesse-Darmstadt, et en Suède, plus récemment, la célèbre Station agronomique de Svalöf, dans la province de Scanie voisine du Danemark.

A partir de 1941 des variétés de colza issues de Hollande et d'Allemagne se sont répandues dans les divers pays d'Europe. En France, on cultive actuellement, comme colzas d'hiver, un colza dit de Hambourg qui a été sélectionné en Hollande, ce « Hambourg-Mansholt » paraît provenir d'une variété ancienne dite nain de Hambourg, déjà connue à la fin du XVIII^e siècle. Plusieurs variétés dites Lembke tirent leur origine de la station de Giessen ; on distingue une variété Lembke-Mecklembourg, une

(1) Nous indiquerons plus loin les raisons de ce choix.

variété Lembke-Alsace et la variété suédoise, Matador, récemment introduite chez nous.

Enfin, le colza parapluie qui était cultivé depuis longtemps en Normandie s'y est maintenu, non point à cause de la teneur en huile de ses graines qui est très moyenne, mais parce qu'il donne dès le début du printemps, une végétation abondante fort appréciée par les éleveurs comme fourrage vert précoce.

La culture des colzas de printemps est relativement peu répandue, elle n'est intéressante qu'à titre de remplacement, lorsque les intempéries ont détruit les colzas d'hiver. On sème en France une variété suédoise dite Régina Svalöf et une variété allemande dite colza Liho. Cette dernière est recherchée pour la production du fourrage vert ; son cycle évolutif, très court, en fait une bonne variété pour cultures dérobées.

En règle générale nous sommes assez peu renseignés sur la façon dont furent obtenues ces nouvelles variétés qui donnent à l'hectare plus d'huile que les anciennes. Une question d'intérêt commercial, parfaitement légitime d'ailleurs, explique la discrétion des sélectionneurs. On a dit que le colza Liho provient du croisement d'un colza de printemps et d'une navette de printemps. Des raisons que nous exposerons plus loin nous portent à croire que les colzas d'hiver dits « Lembke » sont, eux aussi, des hybrides de colzas et de navettes. Le colza Matador serait issu d'une souche Lembke de Giessen sélectionnée à la station suédoise de Svalöf.

Nous avons pu disposer pour nos recherches de cinq variétés différentes de colza dont trois colzas d'hiver : colza Hambourg, colza Lembke, colza parapluie et deux colzas de printemps : colza Liho et colza Régina Svalöf. Nous avons déterminé sur chacune d'elles, 1^o la teneur des graines en huile et 2^o la quantité de sénévol, exprimée en crotonylsénévol, qu'elles pouvaient dégager. Signalons que la teneur en huile des graines de colza varie beaucoup selon les conditions de culture et le climat de l'année.

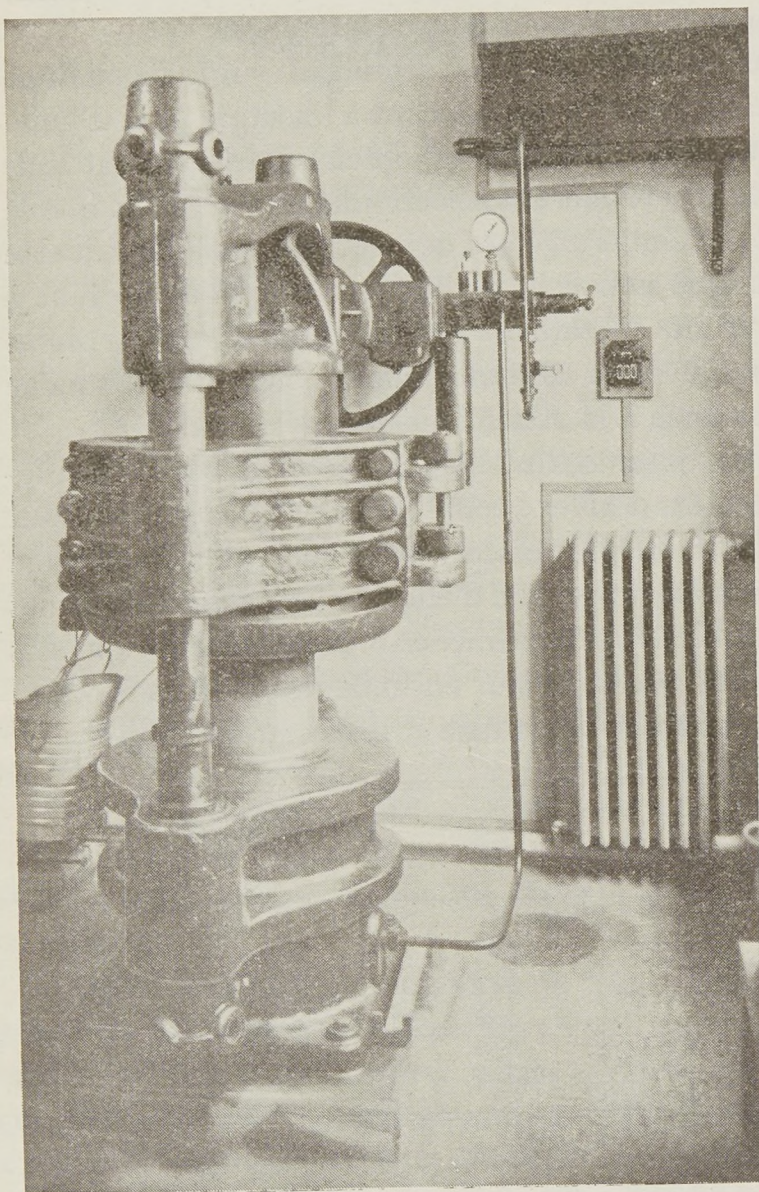
Variétés	Huile %	Crotonylsénévol %
Hambourg	43,1	0,13
Lembke (Soissons)	45,5	0,20
Lembke (Alsace)	49,5	0,20
Parapluie	40,8	0,19
Régina Svalöf	39,9	0,16
Liho	37,5	0,19

OBTENTION DES ESSENCES

Il était préférable à tous égards de préparer les essences non pas à partir des graines elles-mêmes, mais à partir des tourteaux. Indépendam-

ment de l'avantage qu'il y avait à éliminer l'huile fixe, qui occupe inutilement une partie importante des appareils distillatoires, sa récupération évitait le gaspillage et mettait à notre disposition des matériaux d'origine authentique dont l'étude pouvait présenter quelque intérêt.

Nos tourteaux ont été obtenus au moyen d'une presse hydraulique d'un modèle couramment fabriqué par les industriels métallurgistes qui fournissent en matériel les petites huileries artisanales. Ces huileries existent encore en plus grand nombre qu'on ne croit dans les régions où les populations consomment volontiers l'huile de noix, l'huile de pépins de citrouille, voire même l'huile de navette, de pression ou l'huile de lin comestible (souvent mélangée à l'huile de noix).



Nous avons fait installer une petite « huilerie villageoise » dans une salle aménagée dans ce but. Broyeur aplatisseur, réchauffoir mélangeur, presse hydraulique, centrifugeuse et filtre presse ont pu être achetés et installés grâce au crédit qu'a bien voulu nous accorder la Direction de l'Institut de la Recherche Agronomique, que nous ne saurions trop remercier d'avoir mis à notre disposition ce petit « atelier-pilote ».

Notre presse hydraulique permet de mettre en œuvre de 15 à 18 kg de graines en une seule opération. Mieux que toute description, le cliché ci-contre permettra au lecteur de se rendre compte de ses dimen-

sions. On peut en fin d'opération donner une pression de 230 à 250 kg par cm^2 . On procédait en deux temps, une première pression était donnée à froid, le premier tourteau obtenu était rebroyé, la mouture obtenue portée

à 60-70° était soumise à une seconde pression. Le tourteau restant retenait encore entre 10 et 12 p. 100 d'huile.

Nous ne croyons pas utile d'insister longuement sur les détails de la préparation des essences ; ils ont été donnés dans un précédent mémoire paru dans ce même recueil ⁽¹⁾.

Rappelons seulement les points essentiels. Nous obtenons trois sortes d'essences que nous désignons par les lettres A, B et C. L'essence A est celle qui est obtenue de premier jet en rassemblant et en séparant les gouttes qui surnagent les premiers litres d'eau distillée obtenue en faisant circuler un courant de vapeur dans une bouillie claire préparée en mélangeant le tourteau broyé avec trois fois son poids d'eau tiède (35°). On ajoute à cette bouillie des graines de moutarde blanche broyées dans la proportion de 5 p. 100 du poids de tourteau mis en œuvre et l'on abandonne ce mélange à lui-même pendant une heure. Il y a intérêt à ne pas prolonger au-delà de cette durée le temps de macération. Dès que nous avons abordé l'étude des tourteaux préparés par nous-mêmes au laboratoire, nous avons constaté en effet que le rendement en essence est nettement abaissé lorsque l'action des ferments apportés à la fois par les graines de colza et par les graines de moutarde blanche dure plus longtemps. Cet inconvénient est beaucoup moins accusé lorsqu'on met en œuvre les tourteaux achetés aux industriels de l'huilerie parce que les ferments des graines de colza ont été plus ou moins complètement détruits pendant l'extraction de l'huile au moyen des dissolvants et surtout pendant la récupération du solvant retenu par le produit privé d'huile. Il semble exister dans les graines de colza un ferment qui détruit les sénevolts mis en liberté par l'action de la myrosine. Ce ferment ne paraît pas exister dans les graines de moutarde blanche ⁽²⁾.

Pour entraîner à la distillation toute l'essence produite il convient de recueillir deux litres et demi d'eau distillée pour un kilo de tourteau mis en œuvre.

Nous avons dit plus haut que l'essence qui surnage le distillat, recueillie par décantation de l'eau trouble sous-jacente est l'essence A. Les eaux laiteuses sont soumises à une distillation nouvelle. On recueille pendant cette deuxième opération le tiers de leur volume. Une nouvelle quantité d'essence, parfois aussi abondante que la première, peut être récupérée à partir de ce second distillat, nous appelons cette essence, l'essence B.

L'eau lactescente dont on a séparé l'essence B est additionnée de sel marin jusqu'à saturation et agitée à plusieurs reprises avec de l'éther. Les solutions éthérées réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre, filtrées et distillées ; elles laissent comme résidu une troisième fraction d'essence que nous appelons essence C.

⁽¹⁾ *Annales de Technologie Agricole*, 2^e année, n° 4, 1953, p. 243 à 263.

⁽²⁾ Voir à ce sujet une note récente de E. ANDRÉ et Mlle Marie CARBOUERES. *C. R. Ac. des Ss.* t. 237, p. 1274, 1953.

*Résultats obtenus dans la préparation des essences de colzas préparées
à partir de graines de variétés pures*

(Tourteaux préparés au laboratoire. Quantité mise en œuvre : 5 kg)

Dénomination du tourteau	Quantité d'essence contenue dans chaque fraction (grammes)			
	A	B	C	Total
Hambourg	*	1,6	5	6,6
Lembke	2,4	7,7	2,5	12,6
Parapluie	1,7	4,0	4,1	9,8
Régina	4,0	5,4	2,4	11,8
Liho	3,2	3,8	3,2	10,2

* Durée de macération prolongée trop longtemps.

Rendement de chaque opération portant sur 5 kilos de tourteau

Dénomination des tourteaux	Quantité d'essence à obtenir ⁽¹⁾	Quantité d'essence obtenue	Rendement réel %
Hambourg	12,0	6,6	55 *
Lembke	16,0	12,6	78,7
Parapluie	12,5	9,8	78,4
Régina	17,5	11,8	67,3
Liho	14,5	10,2	70,3

* Durée de macération prolongée trop longtemps.

⁽¹⁾ Les rendements théoriques ont été calculés d'après les résultats des dosages selon GADAMER.

On remarquera que le rendement obtenu avec les tourteaux préparés par nous, en évitant de faire agir sur eux une température supérieure à 60°, n'a jamais atteint les taux de 80 à 94 p. 100 antérieurement obtenus avec certains tourteaux fournis par l'industrie, bien que nous ayons beaucoup réduit la durée du temps de macération pendant lequel se produit le dédoublement fermentaire qui donne naissance aux sénevol.

Nous avons fait figurer dans le tableau suivant les propriétés physiques essentielles des diverses essences A, B et C que nous avons obtenues à partir des graines des variétés de colza étudiées. Nous n'avons pas jugé utile d'indiquer ici, à titre de caractères chimiques, les résultats des dosages de sénevol que nous avons effectués par les trois méthodes indiquées dans notre précédent mémoire ⁽¹⁾, méthode gravimétrique, méthode argentimétrique, méthode iodométrique. Ici encore nous avons constaté que la concordance des résultats était assez peu satisfaisante. Il n'y a pas lieu, pensons-nous, d'insister sur cette conclusion déjà acquise.

⁽¹⁾ *Annales de Technologie Agricole*, 2^e année, n° 4, p. 243 à 263, 1953.

Caractères physiques des essences de graines de colzas

		Hambourg	Lembke	Parapluie	Régina	Liho
Densité des essences D_{20}^{20}	A	—	1,001	1,005	1,008	1,006
	B	1,003	1,001	1,005	1,010	1,007
	C	0,993	0,980	0,967	0,969	0,970
Indice de réfraction des essences n_D^{20}	A	—	1,5232	1,5235	1,5241	1,5248
	B	1,5226	1,5233	1,5232	1,5250	1,5244
	C	1,5136	1,5095	1,4975	1,5100	1,4996

DISTILLATION FRACTIONNÉE
DES ESSENCES DE COLZA A, B ET C. —
ESSAIS D'ANALYSE IMMÉDIATE

Nous avons eu en main quatorze échantillons répartis en fractions A, B et C. Nous donnerons seulement, à titre d'exemple, les résultats de la distillation fractionnée des essences A, B et C obtenues à partir des graines de colza de la variété Régina Swalöf.

Distillation fractionnée de l'essence A de colza Régina
Quantité d'essence mise en œuvre 28 g. Pression 15 mm.

N° de la fraction	P. Eb.	Poids	Observations
1.....	62-64°	3	Légère odeur de nitrile en plus de celle du sénévol. Palier net à 65°.
2.....	64-66°	19	
3.....	66-72°	3	
4.....	72-79°	1,5	
Résidu coloré.....		1,5	
Pertes		0	

Distillation fractionnée de l'essence B de colza Régina
Quantité d'essence mise en œuvre 41 g. Pression 15 mm.

N° de la fraction	P. Eb,	Poids	Observations
1.....	47° -63°5	7	Odeur de nitrile en plus de celle de sénévol. Palier net à 65°.
2.....	63°5-68°	26,0	
3.....	68° -72°	0,75	
4.....	72° -79°	4	
Résidu coloré.....		3	
Pertes		0,6	

Distillation fractionnée de l'essence C de colza regina
Quantité d'essence mise en œuvre 40 g. Pression 15 mm.

N° de la fraction	P. Eb.	Poids	Observations
1.....	45° -62°5	5	Odeurs d'éther et de nitriles accompagnent celle du crotonylsénevol. Palier net à 65°.
2.....	62°5-66°	19	
3.....	66° -72°	5	
4.....	72° -78°	4	
Résidu coloré.....		4,5	L'essence étant extraite par l'éther retient toujours un peu de ce solvant.
Pertes		6,2	

Toutes les fractions obtenues dans chacune de nos distillations ont été étudiées. Dans chaque cas la fraction n° 2 marque un palier net dans la courbe des points d'ébullition ; cette fraction est toujours la plus abondante ; elle est constituée par du crotonylsénevol presque pur qui donne en se combinant avec l'ammoniaque une thiourée de premier jet dont le point de fusion est très proche de celui du produit recristallisé une fois dans l'eau (64°) ; sa teneur en soufre est de 28 p. 100 (calculé 28,13).

La fraction n° 4 correspond à l'angélylsénevol presque pur (²⁰D, 1, 5173). Teneur en soufre 25,3 p. 100 (calculé 25,9). Point de fusion de la thiourée 41°.

La composition de l'essence C est relativement assez différente de celle des essences A et B. La fraction 2 (crotonylsénevol) représente un peu moins de 50 p. 100 de la quantité mise à distiller alors qu'elle représente 63 p. 100 dans l'essence B et 68 p. 100 dans l'essence A. L'essence C, extraite à l'éther en retient toujours une petite quantité qui est éliminée au début de la distillation ; ses vapeurs non condensées sont entraînées par la trompe à eau, ce qui provoque en même temps une légère perte des produits de tête (nitriles).

Dans les trois résidus de distillation on a chaque fois pu constater l'existence du phényléthylsénevol. Ces résidus fournissent très facilement de la phényléthylthiourée par action de l'ammoniaque. Il existe dans chacun d'eux dans une proportion voisine de 50 p. 100, le reste étant constitué par des substances goudroneuses.

D'après les courbes de distillation on peut établir approximativement la composition de chacune des essences A, B et C des graines de Colza Régina Swalöf.

Essence	Nitriles	Crotonylsénevol	Angélylsénevol	Résidu
A	très peu	82,0	11	3
B		68,0	14	4
C*		57,0	15	5

* Pertes de produits volatils à la distillation.

Mais la fragmentation que nous avons faite nous a été imposée par la nécessité de mettre au point une technique raisonnée pour obtenir chacune d'elles. En fait l'essence totale était constituée par 34 p. 100 d'essence A, 46 p. 100 d'essence B et 20 p. 100 d'essence C.

Un calcul simple que nous ne développerons pas ici permet d'établir que l'essence totale contient :

Nitriles 5 p. 100, crotonylsénévol 70 p. 100, angélylsénévol 13 p. 100 et phényléthylsénévol 2 à 3 p. 100.

La somme en poids de ces divers constituants représente 90 p. 100, les pertes (10 p. 100) correspondent à des produits volatils ayant échappé à la condensation et aux résidus goudronneux restés dans les ballons.

ÉTUDE DES ESSENCES FOURNIES PAR LES GRAINES DE COLZA DES VARIÉTÉS : LEMBKE, PARAPLUIE ET LIHO

Nous avons dans tous les cas retrouvé les trois mêmes sénévols, mais dans des proportions assez variables. Le colza Lembke mérite une mention particulière. L'essence retirée de ses graines est remarquable par l'homogénéité de sa composition. Dans le mélange de principes immédiats dont elle est constituée la proportion élevée du crotonylsénévol est tout à fait digne d'attention ; elle atteint en effet 86 p. 100 ; l'angélylsénévol représente un peu moins de 4 p. 100 et le phényléthylsénévol 1 p. 100.

Tout au contraire l'essence de graines de colza Liho est beaucoup moins homogène. Le crotonylsénévol ne représente que 61 p. 100, mais l'angélylsénévol existe dans la proportion de 18 p. 100. Cette graine s'est donc révélée comme la matière première de choix pour préparer ce nouveau sénévol en vue d'en entreprendre l'étude.

Composition approximative des essences préparées à partir de tourteaux de graines de colza pressées au laboratoire

Variété	Nitriles	Crotonylsénévol	Angélylsénévol	Phényléthylsénévol
Lembke	0,7	85	3,9	1
Parapluie	1,3	67	5,5	6
Régina	5,0	70	13,0	3
Liho	7,0	61	18,0	4

Nous n'avons pas fait figurer dans le tableau ci-dessus l'essence des graines de colza nain de Hambourg. Une faute de technique au cours de sa préparation (durée de macération trop prolongée) avait diminué beaucoup le rendement. Une partie de l'essence a été détruite et, par ailleurs, la

partie récupérée nous a donné quelques déboires à la distillation ; elle a laissé en effet un résidu goudronneux beaucoup plus important. Aussi ne croyons-nous pas que les données fournies par l'essai d'analyse immédiate que nous avons tenté doivent être considérées comme valables.

ÉTUDE DES ESSENCES DE GRAINES DE NAVETTE

Nous avons indiqué précédemment les relations génétiques qui existent entre les deux espèces, *Brassica napus oleifera* (colza) et *Brassica rapa oleifera* (navette). *Brassica napus* est considéré aujourd'hui par les botanistes généticiens comme un hybride amphidiploïde dans lequel les deux espèces juxtaposées seraient d'une part *Brassica rapa* ($2n = 20$) et un chou (sauvage) *Brassica oleracea* ($2n = 18$). Nous avons déjà insisté sur l'intérêt que pouvait présenter de ce fait l'étude des essences de navette ; nous n'avons donc pas à y revenir.

La navette étant une plante beaucoup moins cultivée que le colza, les matériaux d'étude qui nous ont servi à préparer nos essences ont été beaucoup moins nombreux et moins variés. Nous avons eu à notre disposition deux tourteaux provenant de l'industrie de l'huilerie. L'un d'eux nous a été fourni par M. PRECY, propriétaire-directeur de l'huilerie du Vivier à Châteaurenard près Montargis (Loiret) ; nous tenons à le remercier particulièrement de l'amabilité qu'il a mise à nous procurer un tourteau offrant toute garantie d'authenticité, préparé à notre intention exclusivement par travail à la presse hydraulique. La deuxième pression fut donnée sur une matière chauffée à feu nu dans un chauffeoir à agitation mécanique jusqu'à commencement de torréfaction. La clientèle paysanne apprécie beaucoup le « goût de cuit » que prend l'huile par ce traitement. Cette dernière est d'ailleurs consommée sans qu'il soit nécessaire de la soumettre à aucun raffinage.

Nous avons également pu nous procurer un autre tourteau authentique que nous appelons « tourteau Lamoureux (Ille et Vilaine) ». Enfin, nous avons pressé au laboratoire des graines de navette arrivées de Vitré (Ille et Vilaine) ; ces graines provenaient de la variété dite « Chicon », elles nous ont été vendues comme graines authentiques de semence n'ayant subi aucun traitement conservateur par produit chimique. La première pression a été donnée à froid, la seconde pression a été donnée à une température comprise entre 60 et 70°.

Nous avons préparé nos essences de navette exactement comme nous avons préparé les essences de colza. Le rendement des opérations figure dans les deux tableaux suivants :

Préparation des essences de tourteaux de graines de navette. Quantités d'essences, en grammes, obtenues à partir de 5 kg de tourteau

Dénomination du tourteau	Quantité d'essence obtenue dans chaque fraction			
	A	B	C	Total
Précy	12,5	6,0	7	25,5
Lamoureux	12,0	7,2	4	23,2
Chicon	3,6	10,2	3,3	17,1

Rendement de chaque opération portant sur 5 kg de tourteau

Dénomination du tourteau	Quantité d'essence à obtenir ⁽¹⁾	Quantité d'essence obtenue	Rendement réel %
Précy	26	25,5	98,0
Lamoureux	25	23,2	92,8
Chicon	26,5	17,1	64,5

⁽¹⁾ Calculé d'après le dosage selon GADAMER.

Comme on peut en juger le rendement en essence des deux tourteaux fournis par l'industrie est remarquablement élevé. Pour le tourteau Précy nous avons atteint le chiffre tout à fait remarquable de 98 p. 100 ; pour le tourteau « Lamoureux » le rendement fut un peu moins bon, mais encore très élevé. Cela tient à ce que ces tourteaux de navette provenaient d'huileries artisanales où l'on a conservé des ateliers qui travaillent encore d'après les anciens procédés. Le chauffage effectué avant la deuxième pression détruit entièrement les ferments contenus dans les graines mises en œuvre. Nous avons reconnu que le tourteau Précy broyé et mis à macérer dans l'eau tiède, même pendant plusieurs heures, ne dégage pas d'essence. L'addition de graines de moutarde blanche broyée apporte la myrosine nécessaire pour dédoubler le glucoside à sénevol.

Le tourteau de graines de navette préparé au laboratoire n'a donné qu'un rendement de 65 p. 100 même additionné de graines de moutarde blanche apportant un renfort de myrosine. La conclusion que nous croyons pouvoir tirer de ces faits, c'est qu'il existe dans les graines de navette un ferment qui a détruit une partie du sénevol formé et que ce ferment n'existe pas dans la graine de moutarde blanche.

Nous avons étudié les essences de navette par les mêmes procédés qui avaient été appliqués à l'étude des essences de colza.

Propriétés physiques des essences de navette

		Précy	Lamoureux	Chicon
Densité des essences $D_{0^0}^{0^0}$	A	1 000	1 006	1,009
	B	1 000	1 010	1,008
	C	0,974	0,969	0,985
Indice de réfraction des essences $n_D^{20^0}$	A	1,5228	1,5233	1,5233
	B	1,5227	1,5231	1,5222
	C	1,5164	1,5139	1,5052

Nous avons d'abord préparé des thiourées de premier jet en faisant réagir un excès de solution concentrée d'ammoniaque sur nos essences. Nous avons constaté de suite que la combinaison est plus rapide que dans le cas des essences de colza ; les rendements sont élevés (92 à 98 p. 100), le point de fusion du produit brut s'étale entre 55 et 59°. Après recristallisation dans le benzène on obtient une abondante récolte d'une thiourée à peu près pure (P. F. 64°), tandis que l'on retire des eaux-mères des cristaux fondant entre 57 et 70°. Nous avons vérifié l'identité du produit fondant à 64° avec celui qu'on obtient à partir de l'essence de colza ; leur mélange ne provoque aucun abaissement du point de fusion.

De ces premiers essais on pouvait déjà conclure que l'essence de navette doit avoir une composition beaucoup plus homogène que celle de l'essence de colza.

FRACTIONNEMENT DE L'ESSENCE DE NAVETTE
PAR DISTILLATION SOUS PRESSION RÉDUITE

Nous nous contenterons de donner ici les résultats du fractionnement des essences A, B et C obtenues à partir des graines de navette chicon pressées au laboratoire et ceux obtenus en distillant les essences A et B (mélangées) provenant du tourteau de navette Précy.

DISTILLATION FRACTIONNÉE DES ESSENCES DE GRAINES
DE NAVETTE CHICON

ESSENCE A. — Quantité mise œuvre 16,5. + Pression 15 mm

N° de la fraction	P. Eb.	Poids (g)	Observations
1.....	60-63°	0,25	$N_D^{20^0}$ 1,5220
2.....	63-65°5	15,0	Palier $N_D^{20^0}$ 1,5224
Résidu coloré.....		0,25	
Pertes.....		1	

ESSENCE B. — Quantité mise en œuvre 47,5 g. Pression 15 mm

N° de la fraction	P. Eb.	Poids (g)	Observations
1.....	30° -62°5	7	$N_D^{20^{\circ}}$ 1,5086
2.....	62°5-64°5	36	Palier très net $N_D^{20^{\circ}}$ 1,5232
3.....	64° -75°	2,25	$N_D^{20^{\circ}}$ 1,5214
Résidu coloré.....		1	
Pertes.....		1,5	

ESSENCE C. — Quantité mise en œuvre 12 g. Pression 15 mm

N° de la fraction	P. Eb.	Poids (g)	Observations
1.....	42°-60°	2	$N_D^{20^{\circ}}$ 1,4360
2.....	61°-64°	1	$N_D^{20^{\circ}}$ 1,5027
3.....	64°-64°5	7,5	Palier $N_D^{20^{\circ}}$ 1,5020
Résidu coloré.....		1	
Pertes.....		0,5	

DISTILLATION FRACTIONNÉE DES ESSENCES DE TOURTEAUX DE NAVETTE « PRÉCY ». ESSENCES A ET B RÉUNIES

Quantité mise en œuvre 50 g (25 g essence A + 25 g essence B).
Pression 17-18 mm

N° de la fraction	P. Eb.	Poids (g)	Observations
1.....	63° -66°3	3	Palier net à 69° $N_D^{20^{\circ}}$ 1,5226
2.....	66°5-69°	41	
3.....	69° -77°	4,5	
Résidu coloré.....		1	
Pertes.....		0,5	

Des résultats qui figurent dans les tableaux ci-dessus il ressort que l'essence de navette est constituée surtout par du crotonylsénévol. Sans doute les deux autres sénévols trouvés dans les essences de colza n'en sont point absents mais ils ne s'y trouvent qu'en proportion très faible. L'angélylsénévol existe en faible quantité dans l'essence B de graines de navette chicon , l'essence A et l'essence C ne paraissent pas en contenir. L'essence de tourteau Précy, d'après sa courbe de distillation en contiendrait un peu plus. Dans les résidus de distillation nous avons toujours pu

déceler la présence d'un peu de phényléthylsènevol par formation de la thiourée correspondante.

On trouvera dans le tableau suivant la composition approximative des essences de tourteaux de navette étudiées par nous.

Dénomination du tourteau	Nitrile	Crotonylsènevol	Angélylsènevol	Phényléthylsènevol
Précy.....	2	91	3	1
Lamoureux.....	2,3	84	1 à 2	2 à 3
Chicon.....	4	89,5	?	2
	Fractions de tête	Fractions de cœur (palier à point fixe)	Fractions de queue	Résidus de distillation

En terminant nous croyons devoir insister sur la ressemblance particulière qui existe entre l'essence graines de colza Lembke (voir p. 201) et l'essence de graines de navette. Rappelons que nous avons établi que l'essence de colza Lembke possède la composition approximative suivante :

nitrile 0,7, crotonylsènevol 85, angélylsènevol 4, phényléthylsènevol 1 (pour 100 g de produit).

En se basant sur cette ressemblance, est-on en droit de conclure que la variété de colza Lembke a pour origine probable le croisement d'un colza et d'une navette ? Chimistes et biochimistes estimeront sans doute que cette opinion repose sur une base expérimentale réelle, mais les sélectionneurs et les génétistes accepteraient-ils de considérer cette preuve comme suffisante ? En tout état de cause, nous croyons qu'il était intéressant d'appeler leur attention sur elle.

ÉTUDE D'UNE ESSENCE DE GRAINES DE CHOU-FOURRAGER

Après avoir étudié la composition de l'essence de navette, il convenait d'essayer de fixer, dans la mesure du possible, la composition d'une essence de graines de chou puisqu'il est établi aujourd'hui que le colza est un hybride amphidiploïde dans lequel l'espèce *Brassica rapa* ($2n = 20$) et l'espèce *Brassica oleracea* ($2n = 18$) se trouvent associées.

La culture des choux cultivés est très ancienne et très répandue. Cette culture a donné naissance à une multitude de formes d'aspect fort différent. Quelle variété devait-on choisir pour entreprendre l'étude de la composition chimique de l'essence sulfurée fournie par ses graines ? Notre choix s'est porté vers les choux fourragers parce qu'ils semblent plus proches des choux sauvages que les choux potagers. Nous savions d'autre part que c'est dans ce groupe que les génétistes ont trouvé les variétés qui leur ont servi à réaliser la « synthèse » d'hybrides amphidiploïdes semblables au colza.

Nous nous sommes donc procuré une quantité suffisante de graines d'un chou fourrager dit « chou cavalier » dont nous avons extrait la majeure partie de l'huile à la presse hydraulique. Avec le tourteau nous avons préparé l'essence par fractions A, B et C comme cela a été décrit à propos des essences de colza et de navette.

Les rendements furent mauvais, ils atteignirent seulement 58 p. 100 de la quantité que laissait prévoir le dosage des sénévol d'après GADAMER. Nous n'insisterons pas sur les caractères physiques et chimiques des produits obtenus. Disons de suite que nous avons été très désagréablement surpris en entreprenant l'étude de leur composition par distillation fractionnée. Nous avons constaté en effet que nous avions en mains une essence en majeure partie constituée par de l'allylsénévol. Suivant qu'on avait affaire à l'essence A, à l'essence B ou à l'essence C, la proportion de ce sénévol allait de 84 p. 100 à 66 p. 100, la teneur moyenne de l'essence totale se tenant entre 75 et 80 p. 100.

Les sénévols homologues, crotonylsénévol et angélylsénévol paraissent exister en petites quantités, toutefois nous n'avons jamais réussi à caractériser le phényléthylsénévol dans les résidus goudronneux restés dans les ballons.

Notre choix n'avait pas été heureux. Sans doute conviendrait-il d'étudier les graines de choux sauvages tels que *Brassica Robertiana* du littoral méditerranéen. Mais le moyen de se procurer de ces graines en quantité suffisante (50 kg) pour obtenir un échantillon d'essence assez copieux pour qu'on puisse entreprendre son étude ? C'est cependant en cherchant dans cette voie qu'on aurait le plus de chance de tomber sur le véritable « ancêtre chou » du colza.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans le présent mémoire nous avons étudié diverses essences de colza obtenues à partir de graines de variétés sélectionnées. Nous avons reconnu que les trois sénévols, crotonylsénévol, angélylsénévol et phényléthylsénévol, dont nous avons constaté l'existence dans les essences préparées en partant de tourteaux de colza du commerce se retrouvent tous trois dans les essences de graines sélectionnées. Toutefois la proportion de chacun d'eux est variable.

Le crotonylsénévol est toujours le produit dominant mais, tandis qu'il en existe 85 p. 100 dans l'essence de colza Lembke (variété d'hiver), cette proportion s'abaisse à 61 p. 100 dans l'essence de colza Liho (variété de printemps). Par contre, l'angélylsénévol fort peu abondant (4 p. 100) dans l'essence de colza Lembke existe en proportion élevée (18 p. 100) dans l'essence de colza Liho. Les graines de cette variété se sont révélées

comme la matière première de choix pour obtenir ce dernier composé en vue d'en entreprendre l'étude.

La présence du phényléthylsénévol a été constatée dans toutes les essences que nous avons étudiées. C'est dans l'essence de colza parapluie qu'il paraît être le plus abondant, nous estimons à 6 p. 100 la proportion qu'on y rencontre.

Insistons sur le fait que l'essence de colza Lembke est remarquable par l'homogénéité de sa composition (85 p. 100 de crotonylsénévol).

Nous avons voulu étudier, comparativement aux essences de colza quelques essences de graines de navette ; nous avons reconnu que leur composition est plus homogène encore que celle de l'essence de colza Lembke. Deux sur trois des essences de navette que nous avons étudiées contenaient 89,5 et 91 p. 100 de crotonylsénévol. La troisième en contenait 84 p. 100. Les deux autres sénévols, angélylsénévol et phényléthylsénévol sont présents mais ils n'existent qu'en proportion très faible, 2 à 3 p. 100 pour le premier et 1 à 2 p. 100 pour le second.

Ces diverses constatations nous ont amenés à penser que la variété dite « colza Lembke » qui fournit une essence de composition très voisine de celle des essences de navette pourrait avoir été obtenue par croisement d'un colza et d'une navette. Les génétistes estimeront, avec quelque raison, que cette parenté biochimique n'apporte pas une preuve suffisante. Nous avons tenu cependant à ne pas la passer sous silence, estimant que les caractères biochimiques peuvent déjà prendre place à côté des caractères morphologiques et micrographiques pour fixer l'identité des espèces végétales.

Reçu pour publication le 27 mars 1954.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DES POIRES A POIRÉ AU COURS DE LA CROISSANCE ET DE LA MATURATION

PAR

P. JACQUIN et J. TAVERNIER

Station de Recherches Pomologiques et Cidricoles
de Rennes

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Évolution des principaux constituants.

- 1^o Méthodes analytiques.
- 2^o Acidité de titration.
- 3^o Acides malique et citrique.
- 4^o Alcalinité des cendres.
- 5^o Réaction p.H.
- 6^o Sucres : lévulose, glucose et saccharose.
- 7^o Tannoïdes.

III. — Conclusions.

IV. — Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

En établissant dans un travail précédent (1), le bilan acidimétrique des poires à poiré, nous avons signalé que, si certaines variétés présentaient une acidité organique constituée en majeure partie par l'acide malique, comme c'est le cas pour les pommes, par contre, l'acide citrique prédominait dans certaines variétés et pouvait représenter jusqu'à 68 p. 100 de l'acidité organique totale.

Il nous a paru intéressant de suivre l'évolution des acides malique et citrique au sein du fruit au cours de sa croissance, jusqu'à sa maturité de cueillette et de compléter ce travail en l'appliquant également aux sucres, aux tannoïdes, à l'alcalinité des cendres et à la mesure du pH. Appliquées à des fruits récoltés à différents stades de croissance, ces analyses permettent d'apporter une contribution à l'étude des phéno-

mènes résultant à la fois de l'apport des matériaux issus de l'arbre et du métabolisme propre du fruit.

L'étude des transformations chimiques qui se produisent dans le sein du fruit, au cours de sa croissance et de sa maturité est très complexe, du fait que nos connaissances sur la constitution chimique des fruits sont encore bien incomplètes et que seuls, certains constituants peuvent être dosés par des méthodes analytiques spécifiques et précises.

II. — ÉVOLUTION DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS

1^o Méthodes analytiques

Nos recherches ont porté sur quatre variétés de poires à poiré cultivées dans le verger de la Croix-Rouge de l'École Nationale d'Agriculture de Rennes, poiriers âgés d'une cinquantaine d'années : *Carisi*, *Graneville*, *Rousset*, *Souris*, poires de seconde saison de maturité mûrissant à l'arbre et récoltées normalement en octobre.

Cinq prélèvements de poires ont été effectués aux dates suivantes : 25 mai, 21 juin, 2 août, 31 août et 2 octobre 1950, soit à un nombre de jours précis après la pleine floraison.

Les renseignements complémentaires sur ces prélèvements sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I

	Dates de prélèvements				
	25/5/50	21/6/50	2/8/50	31/8/50	2/10/50
<i>Carisi</i> :					
Nombre de jours après pleine floraison .	47	74	116	145	177
Nombre de poires au kg	570	180	63	36	25
Poids d'une poire en g.....	1,754	5,55	16,0	27,7	40,0
<i>Graneville</i> :					
Nombre de jours après pleine floraison .	43	70	112	141	173
Nombre de poires au kg	700	227,5	85	48	33
Poids d'une poire en g.....	1,43	4,03	11,75	20,8	30,3
<i>Rousset</i> :					
Nombre de jours après pleine floraison .	25	52	94	123	155
Nombre de poires au kg	690	165	55	35	20
Poids d'une poire en g.....	1,45	6,10	18,1	28,6	50,0
<i>Souris</i> :					
Nombre de jours après pleine floraison .	47	74	116	145	177
Nombre de poires au kg	490	155	59	34	23
Poids d'une poire en g.....	2,04	6,41	17,0	29,4	43,5

Estimant que pour obtenir des résultats analytiques offrant une garantie suffisante, le travail doit être conduit sur un nombre assez élevé de fruits et étant donné la difficulté de prélever un échantillon

homogène, nous avons préféré opérer sur le moût obtenu par rapage et pressurage d'un nombre important de poires. De ce fait, nos résultats analytiques sont rapportés au litre de moût de poires.

Sitôt la cueillette, les poires ont été râpées, puis pressées et les moûts obtenus ont été soumis immédiatement à l'analyse.

Nous indiquerons succinctement les méthodes analytiques utilisées pour chaque détermination :

Densité à 15°C : Méthode classique par le densimètre de précision.

Degré réfractométrique à 20°C : Mesure au réfractomètre O. P. L.

Réaction pH. à 18°C : Mesure à l'électrode à quinhydrone.

Acidité de titration : Dosage à chaud, en dilution aqueuse, par la soude N/10, avec comme indicateur un mélange de bleu de bromothymol et de rouge de phénol, préconisé par Burroughs (3-2).

Acide malique : Dosage par oxydation permanganique par la méthode de Peynaud (4-2).

Acide citrique : Dosage par oxydation permanganique par la méthode de Kogan, technique de Peynaud (4-2).

Sucres : Dosage polarimétrique classique et dosage chimique suivant G. BERTRAND, avant et après interversion du saccharose, les moûts étant déféqués au sous-acétate de plomb (5).

Tannoïdes : Méthode classique de Loewenthal.

Alcalinité des cendres : Titrage en retour par la soude N/10, en présence de rouge de méthyl comme indicateur (2).

Les résultats analytiques se rapportant aux poires à poiré *Carisi*, *Graneville*, *Rousset* et *Souris* sont rapportés dans les tableaux II, III, IV, V, suivants :

TABLEAU II
Poire à poiré Carisi

Résultats analytiques du moût	Dates de prélèvements et nombre de jours après pleine floraison				
	25/4/50	21/6/50	2/8/50	31/8/50	2/10/50
	47	74	116	145	177
Densité à 15°C	1 031,2	1 042,0	1 048,8	1 048,8	1 046,3
Degré réfractométrique à 20°C	7,2	10,8	12,1	11,8	11,5
Réaction pH à 18°C	5,0	3,85	3,40	3,30	3,33
Acidité de titration en m éq/litre	52	169,0	205	124,0	78,0
Alcalinité des cendres, en m éq/litre	162,5	89,5	42,5	36,0	25,0
Somme des cations, en m éq/litre	214,5	258,5	247,5	160,0	103,0
Acide malique, en m éq/litre	127,6	238,0	220,0	131,0	74,5
Acide citrique, en m éq/litre	9,64	10,4	15,28	18,0	12,16
Sucres totaux, en g/litre	10,90	22,10	62,8	73,75	84,4
Sucres réducteurs, en g/litre	8,57	22,10	62,0	71,3	80,5
Saccharose, en g/litre	2,00	néant	0,6	2,3	3,3
Glucose, en g/litre	1,76	5,1	18,3	16,35	26,6
Lévulose, en g/litre	6,81	17,0	43,7	54,95	57,8
Tannoïdes, en g acide tannique/litre	2,88	7,45	6,88	3,32	2,48

TABLEAU III

Poire à poiré Graneville

Résultats analytiques du moût	Dates de prélèvements et nombre de jours après pleine floraison				
	25/5/50 43	21/6/50 70	2/8/50 112	31/8/50 141	2/10/50 173
Densité à 15°C	1 036,5	1 047,0	1 052,3	1 060,5	1 068,5
Degré réfractométrique à 20°C	8,7	12,4	14,7	14,95	16,80
Réaction pH à 18°C	4,60	3,62	3,24	3,24	3,20
Acidité de titration, en m éq/litre	79,0	202,0	264,0	173,0	118,0
Alcalinité des cendres, en m éq/litre	146,5	77,5	46,5	31,0	26,0
Somme des cations, en m éq/litre	225,5	279,5	310,5	204,0	144,0
Acide malique, en m éq/litre	154,0	253,0	222,0	68,0	15,0
Acide citrique, en m éq/litre	10,2	10,0	62,3	102,3	102,0
Sucres totaux, en g/litre	7,45	16,7	60,0	91,1	125,5
Sucres réducteurs, en g/litre	5,92	16,7	58,7	85,9	114,8
Saccharose, en g/litre	1,34	néant	0,4	5,0	9,7
Glucose, en g/litre	0,55	4,0	10,0	14,3	31,0
Lévulose, en g/litre	5,37	12,7	48,7	71,6	83,8
Tannoïdes, en g acide tannique/litre	4,0	8,08	10,16	7,52	5,36

TABLEAU IV

Poire à poiré Rousset

Résultats analytiques du moût	Dates de prélèvements et nombre de jours après pleine floraison				
	25/5/50 25	21/6/50 52	2/8/50 94	31/8/50 123	2/10/50 155
Densité à 15°C	1 036,5	1 048,0	1 061,2	1 061,2	1 062,8
Degré réfractométrique à 20°C	9,0	13,0	16,1	15,15	15,65
Réaction pH à 18°C	4,40	3,30	3,10	3,10	3,03
Acidité de titration, en m éq/litre	77,0	290,0	349,0	261,0	176,0
Alcalinité des cendres, en m éq/litre	131,0	63,0	61,5	41,5	32,0
Somme des cations, en m éq/litre	208,0	353,0	410,5	302,5	208,0
Acide malique, en m éq/litre	91,3	310,0	364,0	267,0	183,0
Acide citrique, en m éq/litre	5,64	8,2	8,8	6,64	10,64
Sucres totaux, en g/litre	10,20	17,6	56,4	81,0	106,5
Sucres réducteurs, en g/litre	8,47	17,6	56,4	74,75	92,5
Saccharose, en g/litre	1,5	néant	néant	6,0	12,9
Glucose, en g/litre	—	0,4	3,3	7,25	20,1
Lévulose, en g/litre	8,47	17,2	53,1	67,5	72,4
Tannoïdes, en g acide tannique/litre	6,72	17,6	13,28	9,52	8,88

TABLEAU V
Poire à poiré Souris

Résultats analytiques du moût	Dates de prélèvements et nombre de jours après pleine floraison				
	25/5/50 47	21/6/50 74	2/8/50 115	31/8/50 145	2/10/50 177
Densité à 15°C	1 034,6	1 055,0	1 069,5	1 068,1	1 074,3
Degré réfractométrique à 20°C	7,8	15,1	17,8	16,7	18,2
Réaction pH à 18°C	4,67	3,60	3,35	3,38	3,40
Acidité de titration, en m éq/litre	90,0	242,0	240,0	155,0	96,0
Alcalinité des cendres, en m éq/litre	195,0	103,0	61,0	37,5	37,0
Somme des cations, en m éq/litre	285,0	345,0	301,0	192,5	133,0
Acide malique, en m éq/litre	202,4	335,0	288,0	178,0	124,0
Acide citrique, en m éq/litre	7,6	8,6	10,4	5,04	4,4
Sucres totaux, en g/litre	11,35	19,6	85,2	106,25	140,25
Sucres réducteurs, en g/litre	10,05	19,6	85,2	102,9	127,9
Saccharose, en g/litre	1,34	néant	néant	3,1	11,9
Glucose, en g/litre	3,15	1,2	4,6	6,0	19,9
Lévulose, en g/litre	6,90	18,4	80,6	96,9	108,0
Tannoïdes, en g acide tannique/litre	4,88	16,8	12,32	8,64	6,56

2° Acidité de titration

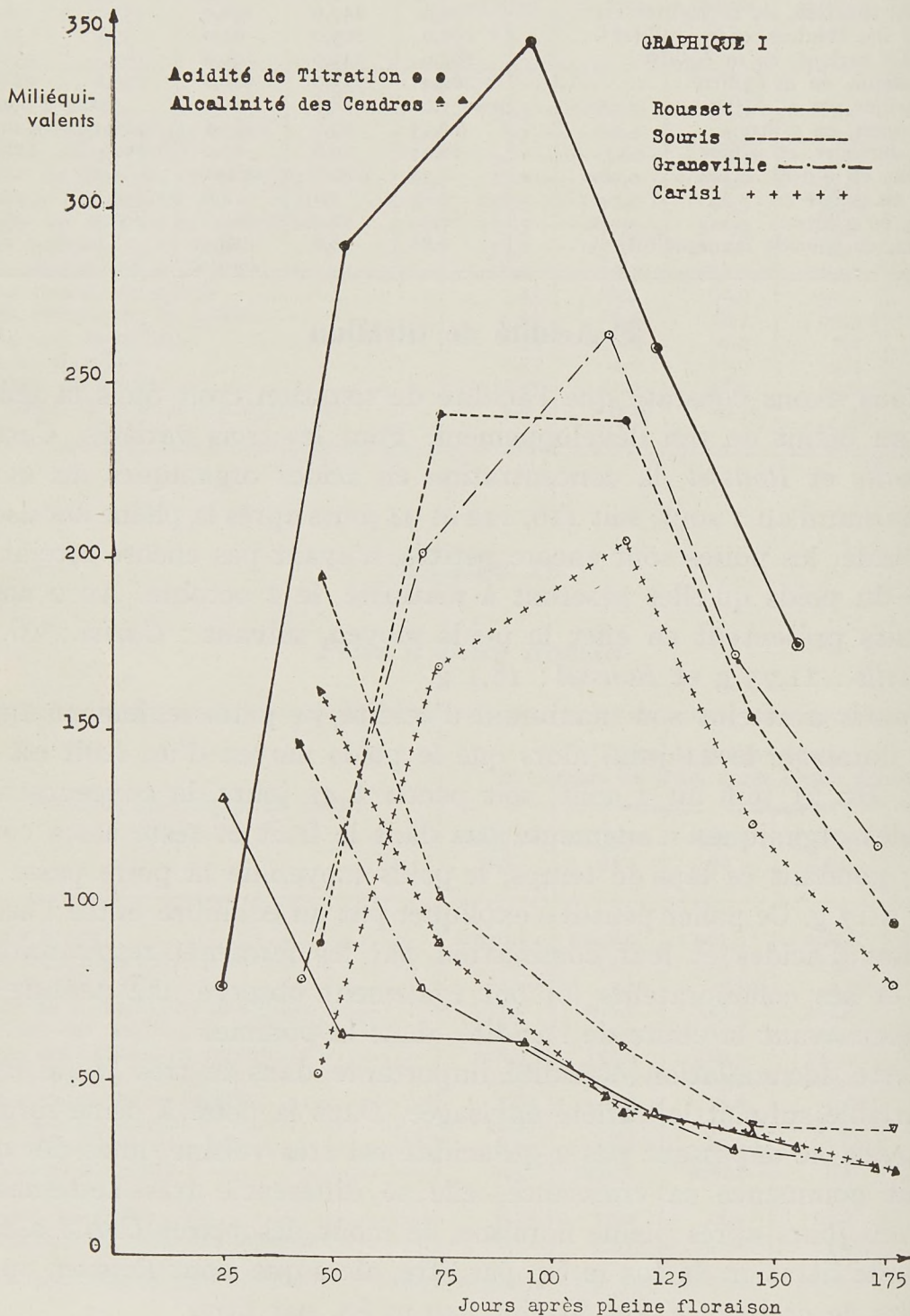
Nous avons constaté que l'acidité de titration croît dans la jeune poire au début de son développement. Pour les trois variétés, *Carisi*, *Graneville* et *Rousset*, la concentration en acides organiques du moût est maximum au 2 août, soit 116, 112 et 94 jours après la pleine floraison. A ce stade, les poires sont encore petites, n'ayant pas encore atteint la moitié du poids qu'elles pèseront à maturité, le 2 octobre. Au 2 août, ces fruits présentent en effet le poids moyen suivant : *Carisi* : 16 g ; *Graneville* : 11,75 g et *Rousset* : 18,1 g.

Souris a atteint son maximum d'acidité 74 jours seulement après pleine floraison, le 21 juin, alors que le poids moyen d'un fruit est de 6,41 g. Du 21 juin au 2 août, soit pendant 42 jours, la concentration en acides organiques n'augmente pas dans le fruit et reste assez constante ; pendant ce laps de temps, le poids moyen de la poire passe de 6,41 g à 17 g. Ce palier peut-il s'expliquer par un équilibre entre l'accumulation d'acides et leur combustion par les ferments respiratoires ? KIDD et ses collaborateurs (6) ont également observé une période de constance avant la chute de l'acidité, dans la pomme.

Cette accumulation d'acidité importante dans le très jeune fruit est variable suivant la variété envisagée. Dans la poire à peine formée d'un poids ne dépassant pas 2 g l'acidité est très voisine, mais dès que le fruit commence sa croissance, elle se différencie très nettement : ainsi 116 jours après pleine floraison, le moût des poires *Carisi* a une acidité de titration de 205 m éq. par litre, alors que pour *Rousset*, après 94 jours de croissance, elle atteint 349 m éq. par litre.

A partir du 2 août, on constate une chute brutale de l'acidité de titration, l'oxydation se poursuivant jusqu'à la maturité de cueillette de ces poires, au 2 octobre, la perte se chiffrant à 49,5 p. 100 (*Rousset*) à 61,9 p. 100 (*Carisi*) de l'acidité totale de titration. Malgré cette combustion importante des acides organiques, les poires conservent une acidité importante et les fruits ayant accumulé les plus hautes teneurs en acides restent, à maturité, les fruits les plus acides.

Le graphique I fait nettement ressortir ces résultats.



3° Acides malique et citrique

Le dosage des acides malique et citrique dans les moûts de ces quatre variétés, récoltées à maturité permet de classer ces poires en 2 catégories :

1° poires pauvres en acide citrique : *Carisi*, *Rousset* et *Souris*,

2° poire riche en acide citrique : *Graneville*.

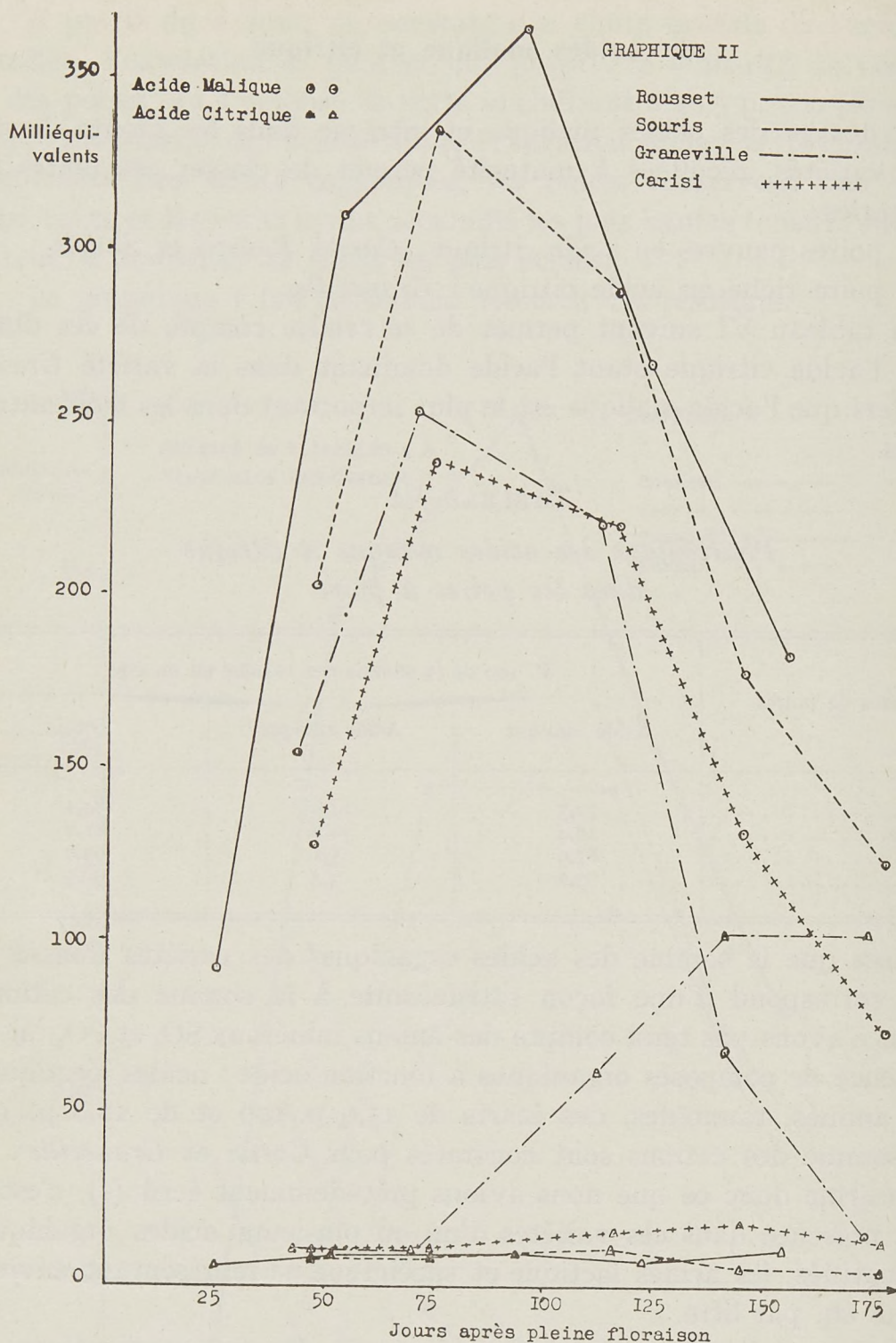
Le tableau VI suivant permet de se rendre compte de ces différences, l'acide citrique étant l'acide dominant dans la variété *Graneville*, alors que l'acide malique est le plus important dans les trois autres variétés.

TABLEAU VI
*Pourcentage des acides malique et citrique
dans les poires à poiré*

Variétés de poires	P. 100 de la somme des cations en m. équ.		
	Acide malique	Acide citrique	Total
Carisi	72,3	11,8	84,1
Graneville.....	10,4	70,8	81,2
Rousset	87,9	5,1	93,0
Souris.....	93,2	3,3	96,5

Alors que la somme des acides organiques des variétés *Rousset* et *Souris* correspond d'une façon satisfaisante à la somme des cations, car nous n'avons pas tenu compte des anions minéraux SO_4 et PO_4 , ni de la présence de composés organiques à fonction acide : acides pectiques, acides aminés, tannoïdes, des écarts de 15,9 p. 100 et de 18,8 p. 100 de la somme des cations sont constatés pour *Carisi* et *Graneville* : ce fait confirme donc ce que nous avons précédemment écrit (2), c'est-à-dire la présence dans ces variétés d'un ou plusieurs acides organiques non identifiés, les acides lactique et succinique ne représentant environ que 1 m équ. par litre.

En dosant l'acide malique dans le moût de ces quatre poires, au début de leur vie, c'est-à-dire lorsque le poids d'un fruit oscille entre 1,43 g et 2,04 g suivant la variété envisagée, l'acide malique libre et salifié est déjà important et se chiffre de 91,3 m équ. (*Rousset*) par litre à 202,4 m équ. (*Souris*) par litre, chaque variété présentant une teneur nettement différente alors que l'acidité de titration de chacun de ces moûts est très voisine l'une de l'autre : cette constatation peut s'expliquer vraisemblablement par une saturation plus ou moins importante de l'acide malique salifié de chaque moût.



La concentration en acide malique augmente pendant un mois environ, jusqu'au 21 juin pour trois variétés : *Carisi*, *Graneville*, *Souris*, la quatrième variété *Rousset* accumulant de l'acide malique plus tardivement jusqu'au 2 août. Ceci s'explique par le fait que cette variété étant de floraison plus tardive, les poires, au 21 juin étant âgées d'une vingtaine de jours de moins que celles des trois autres variétés, la croissance de ces fruits avait donc un certain retard par rapport à celui des autres variétés.

Jusqu'au 21 juin, la concentration en acide citrique des moûts de ces quatre variétés est très faible et pratiquement identique : de 8,2 m éq. (*Rousset*) à 10,4 m éq. (*Carisi*) par litre.

C'est à partir de cette date que se différencient nettement les variétés de poires pauvres en acide citrique de la variété étudiée riche en cet acide.

La teneur en acide malique des moûts de *Carisi*, *Rousset* et *Souris* baisse régulièrement et fortement jusqu'à la maturité de cueillette des fruits (2 octobre), la concentration en acide citrique ne varie pratiquement pas et ne dépasse pas 15 m éq. par litre.

Par contre, avec *Graneville*, la concentration en acide citrique augmente régulièrement du 21 juin au 31 août, atteignant 102 m éq. et se stabilisant à cette concentration jusqu'au 2 octobre, date de maturité de ces fruits.

Pendant ce temps, on constate une chute extrêmement importante de l'acide malique libre et salifié, le moût de poires à maturité, fruits âgés de 173 jours ne renfermant plus que 15 m éq. par litre, bien que la concentration en acide malique du moût des fruits âgés seulement de 70 jours, ait atteint 253 m éq. par litre.

Ce changement dans la composition chimique de l'acidité organique qui se produit au cours du métabolisme d'une variété de poires à poiré était intéressant à signaler.

L'acide citrique augmentant dans cette variété lorsque la chute de l'acide malique commence, peut-on envisager que l'acide citrique dérive de l'acide malique et que cette transformation hypothétique fasse partie du cycle des acides organiques dans la cellule vivante : l'acide malique oxydé par une malique-déshydrase en acide oxalacétique, qui sous l'action d'une carboxylase donnerait de l'acide pyruvique qui participerait à la synthèse de l'acide cis-aconitique et finalement de l'acide citrique ?

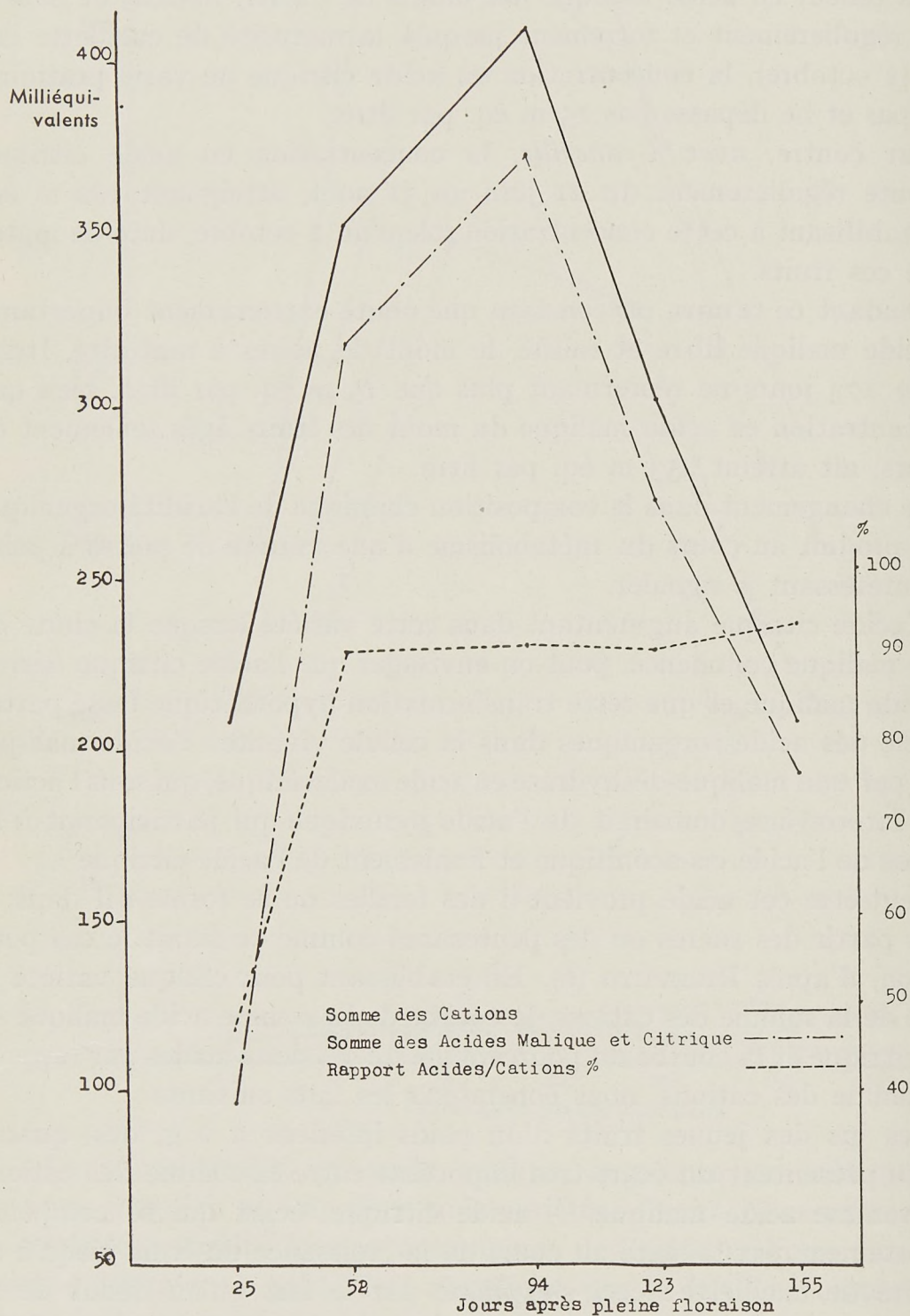
Peut-être cet acide provient-il des feuilles ou se forme-t-il dans le fruit à partir des sucres ou des pentosanes comme ce serait le cas pour le citron, d'après RICEVUTO (6). En établissant pour chaque variété la courbe de la somme des cations, la courbe de la somme acide malique + acide citrique et la courbe du pourcentage de ces deux acides par rapport à la somme des cations, nous constatons les faits suivants :

Les jus des jeunes fruits d'un poids inférieur à 2 g, des quatre variétés présentent un écart très important entre la somme des cations et la somme acide malique + acide citrique, écart qui se compense très fortement par la suite au cours de la croissance du fruit jusqu'à sa maturité de cueillette : ceci s'explique par le fait qu'au début de sa croissance, le jus extrait du fruit possède une composition plus voisine de la sève que d'un moût de poire. Ce jus renferme certainement des acides organiques intermédiaires utilisés par la suite à la synthèse de l'acide malique.

Avec les variétés *Rousset* et *Souris*, le pourcentage de la somme acide malique + acide citrique par rapport à la somme des cations atteint respectivement à la maturité de cueillette : 93 p. 100 et

GRAPHIQUE III

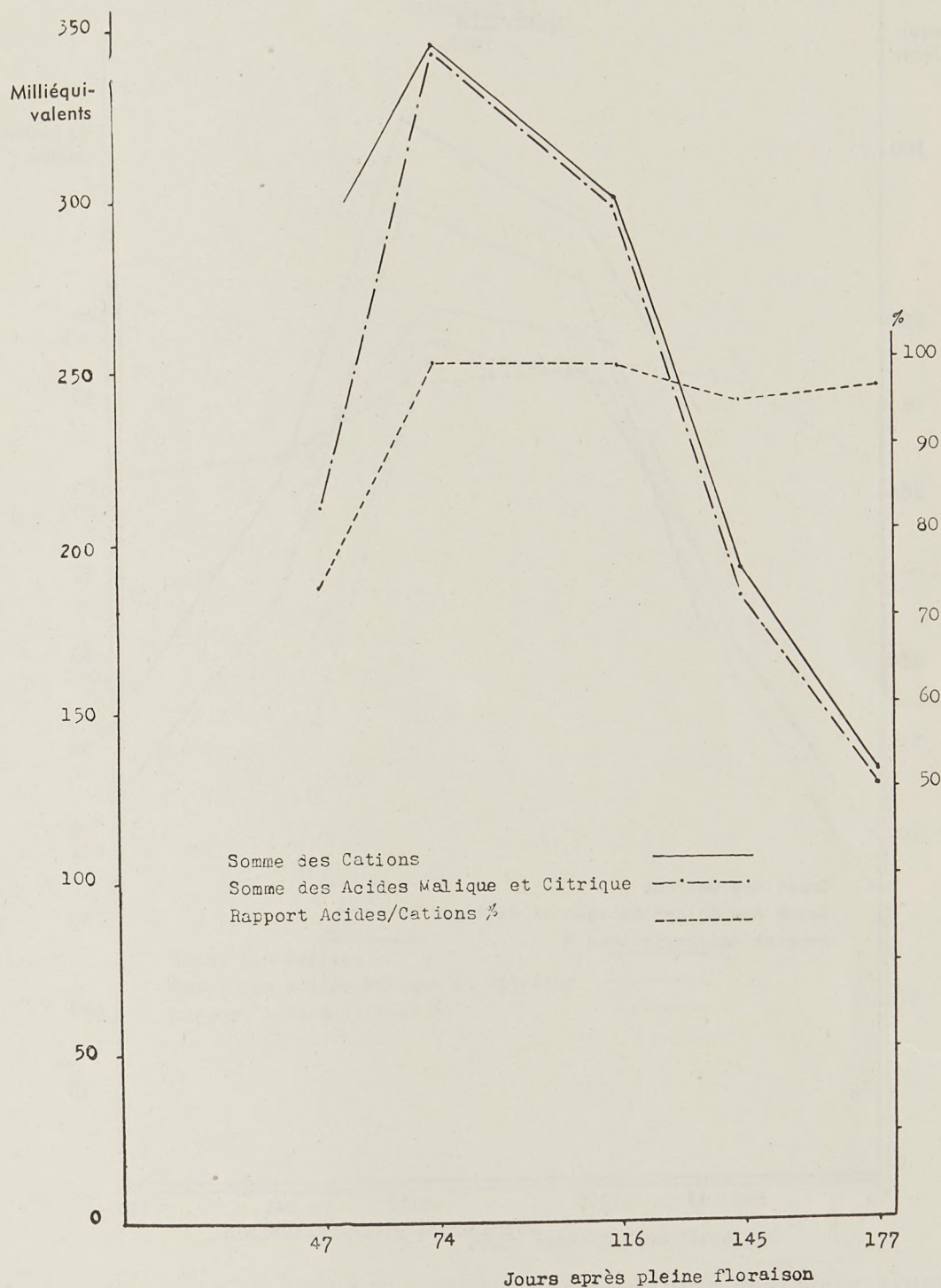
ROUSSET



96,5 p. 100 Ce pourcentage reste assez constant au cours de la croissance des fruits de ces variétés qui passent pour *Rousset* de 6,1 g à 50 g et pour *Souris* de 6,41 g à 43,5 g.

Avec *Graneville*, poire riche en acide citrique, le pourcentage de la somme acide malique + acide citrique par rapport à la somme des cations, diminue régulièrement dès que le fruit atteint 4 g et tombe

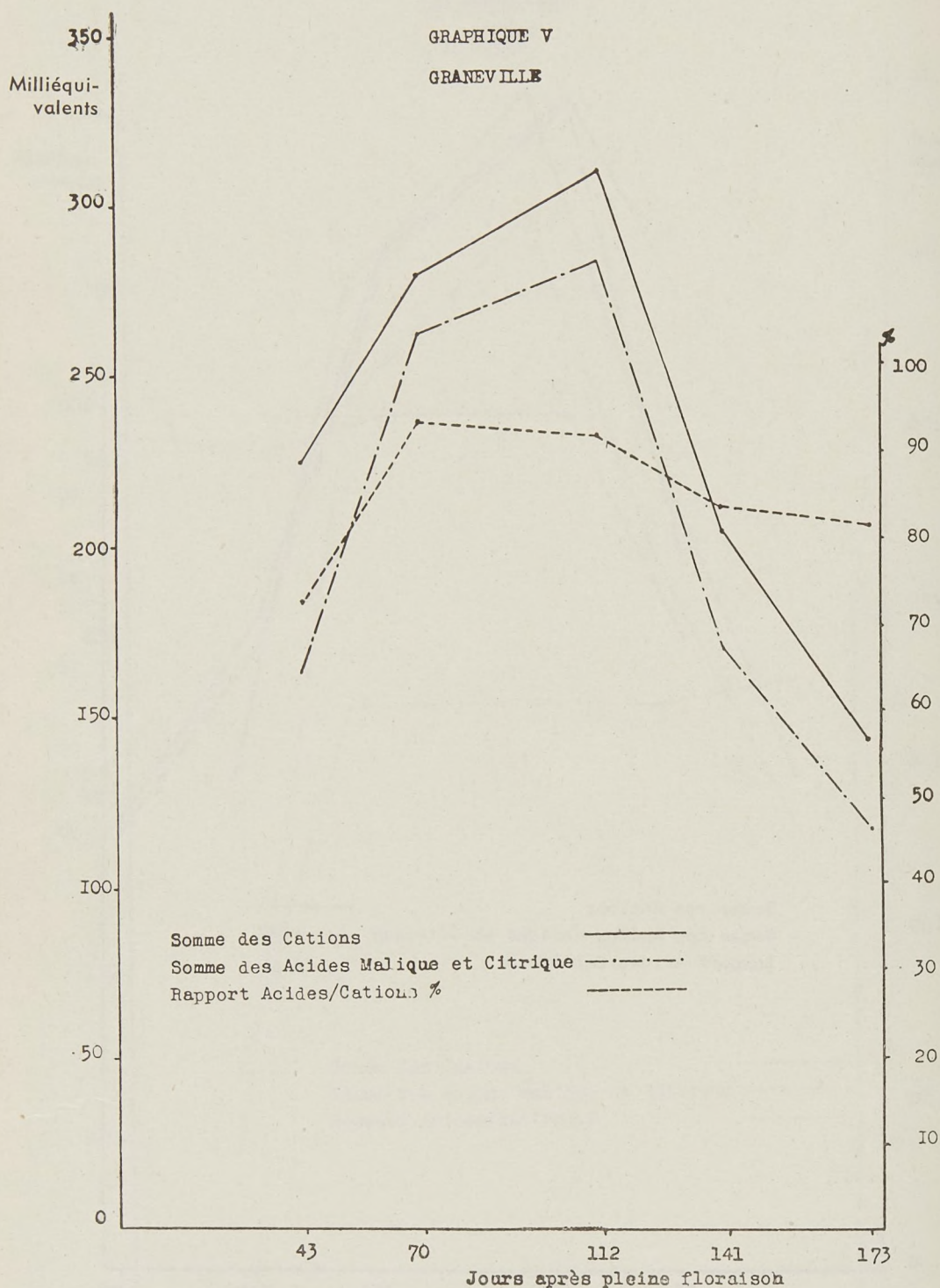
GRAPHIQUE IV
SOURIS



à 81,2 p. 100 lorsque le fruit atteint sa maturité de cueillette et pèse 30,3 g, soit 173 jours après pleine floraison. Cette chute qui s'amorce au moment où la concentration en acide citrique augmente, indique que c'est à partir de ce point également que se forme le ou les acides organiques.

manquant à notre bilan et que nous n'avons pas réussi à déterminer jusqu'ici.

Avec *Carisi*, poire légèrement plus riche en acide citrique que *Rousset*

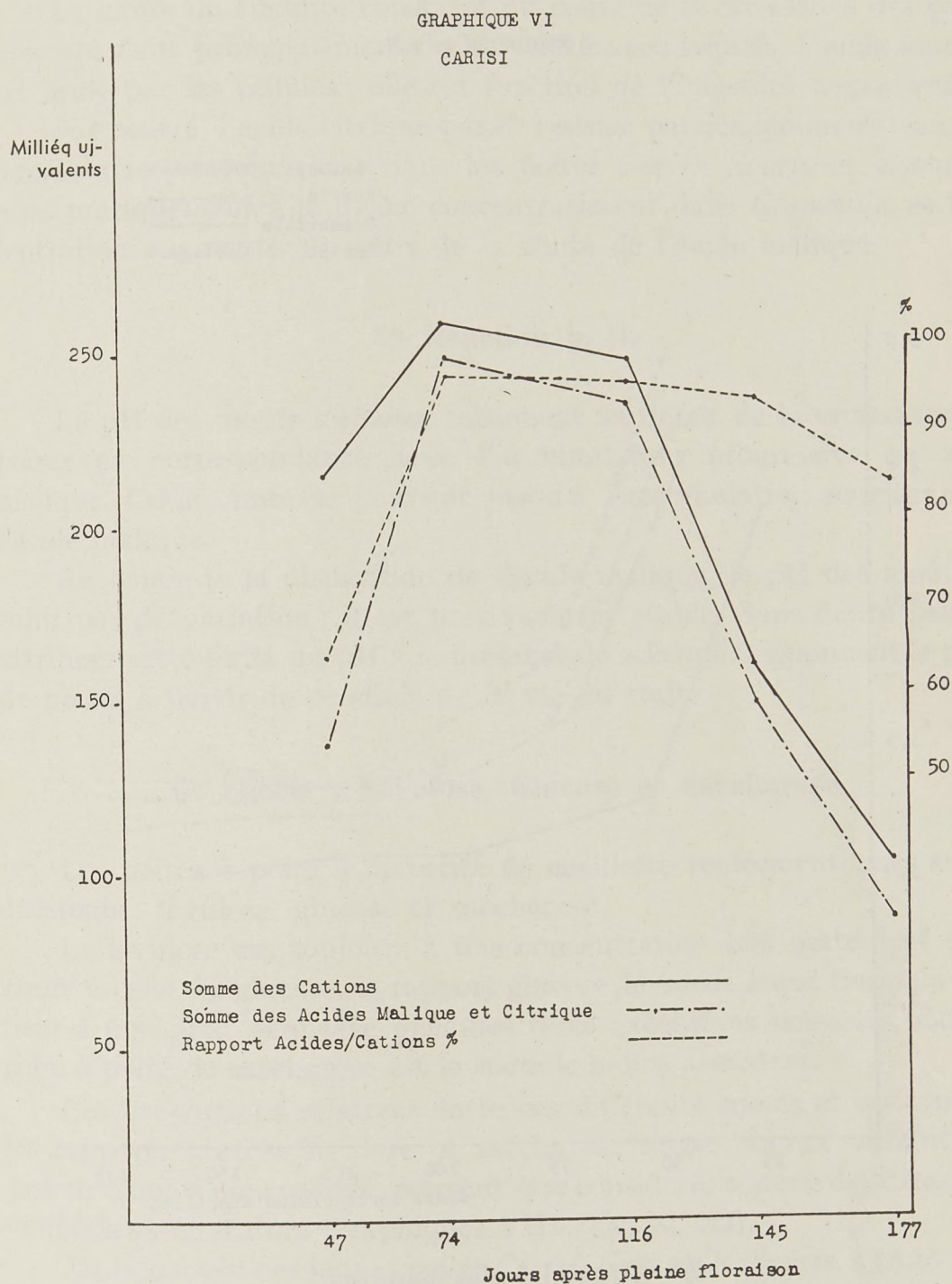


et *Souris*, mais bien plus pauvre que *Graneville*, nous constatons le même phénomène : le pourcentage de la somme acide malique + acide citrique par rapport à la somme des cations s'abaisse à 84,1 p. 100 lorsque le fruit atteint 40 g, soit 177 jours après pleine floraison.

Cette chute s'amorce 116 jours après pleine floraison, la poire pesant

16 g : elle indique donc que c'est vers ce point qu'apparaissent le ou les acides organiques non déterminés et manquant à notre bilan.

Ces faits permettent donc de préciser 3 types différents chez les poires à poiré :



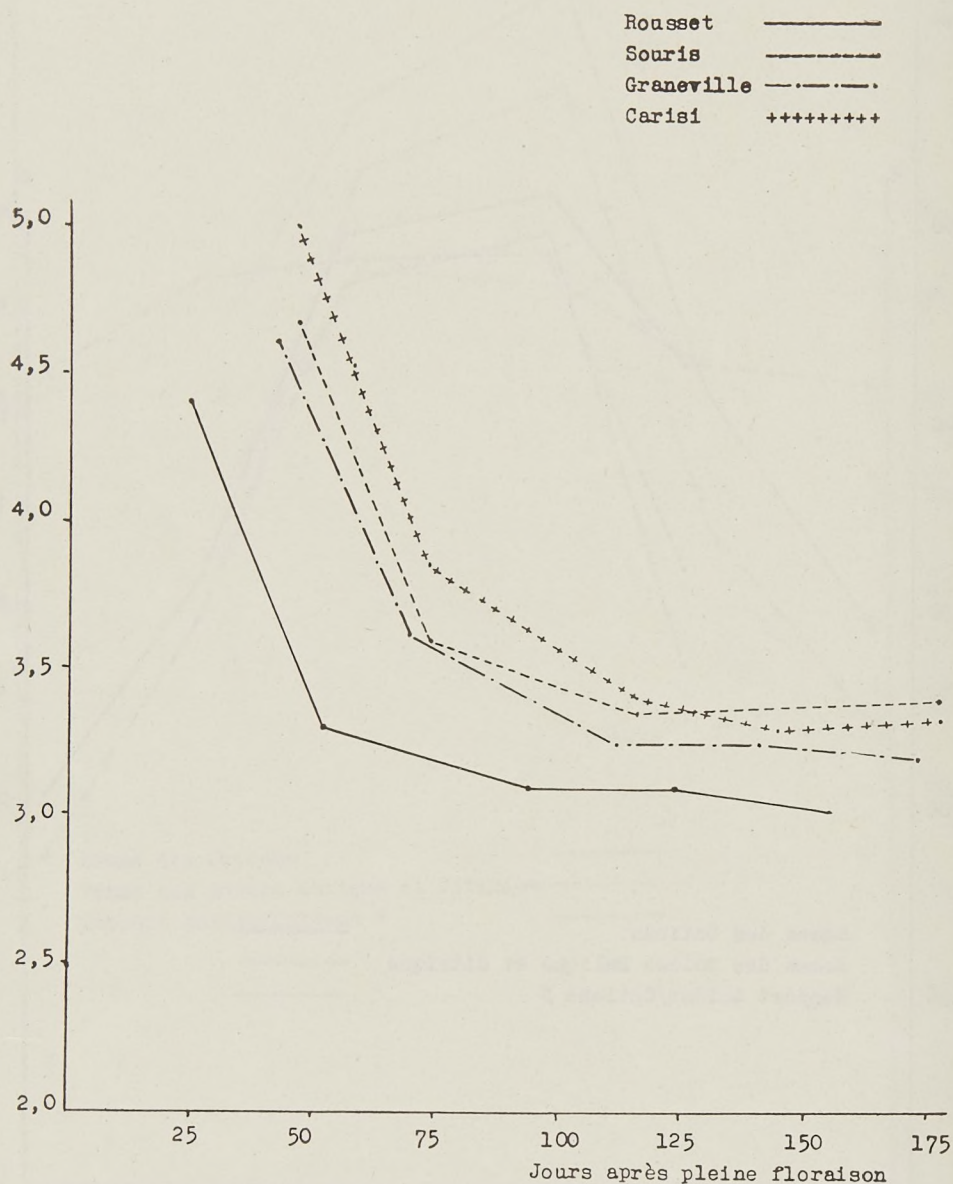
a) poires dont l'acidité est constituée pour 90 p. 100 environ par de l'acide malique et par 5 p. 100 environ d'acide citrique.

b) poires dont l'acidité est constituée par 70 p. 100 environ d'acide citrique, 10 p. 100 environ d'acide malique et près de 20 p. 100 d'acides non déterminés.

c) poires dont l'acidité est constituée par 70 p. 100 environ d'acide malique, 10 p. 100 environ d'acide citrique et 15 à 20 p. 100 environ d'acides non déterminés.

GRAPHIQUE VII

EVOLUTION du p.H.



4° Alcalinité des cendres

Il ne semble pas que l'on puisse attribuer en grande partie la diminution de l'acidité de titration, au cours de la vie du fruit, à la neutralisation des acides par des bases.

En effet, c'est au début de sa vie que le jeune fruit donne un jus dont l'alcalinité des cendres est maximum (graphique I).

Alors que l'alcalinité des cendres du moût décroît au cours de deux mois, l'acidité de titration continue de croître régulièrement. Puis lorsque l'acidité diminue, l'alcalinité des cendres, elle, continue toujours à décroître.

La chute de l'acidité constatée au cours de la croissance des poires provient donc principalement de la facilité avec laquelle l'acide malique est brûlé par les cellules ; elle est fonction de l'intensité respiratoire.

Par contre, l'acide citrique paraît résister particulièrement bien aux ferments respiratoires, car dans les poires *Carisi*, *Souris* et *Rousset* il reste pratiquement à la même concentration et dans *Graneville*, sa concentration augmente au cours de la chute de l'acide malique.

5° Réaction p. H.

Le pH des moûts s'abaisse fortement au début de la croissance des poires en correspondance avec l'accumulation progressive en acide malique. Cette chute se poursuit jusqu'à l'accumulation maximum de l'acide malique.

Au cours de la disparition de l'acide malique, le pH des moûts ne subit pas de variation : il est pratiquement stable. Sans doute peut-on attribuer cette fixité du pH à la présence de sels qui tamponnent le moût de poires à partir de ce stade de la vie du fruit.

6° Sucres : Lévulose, Glucose et Saccharose

Les poires à poiré à maturité de cueillette renferment trois sucres différents : lévulose, glucose et saccharose.

Le lévulose est toujours à une concentration très nettement supérieure à celle du glucose, le rapport glucose/lévulose étant toujours inférieur à 0,5. Sauf peut-être quelques rares exceptions possibles, dans la poire à poiré, le saccharose est le sucre le moins abondant.

Les proportions relatives entre ces différents sucres et notamment les rapports glucose-lévulose et saccharose/sucres totaux variant très peu chez une même variété, peuvent être considérés comme des caractères variétaux assez stables (graphiques VIII, IX, X, XI).

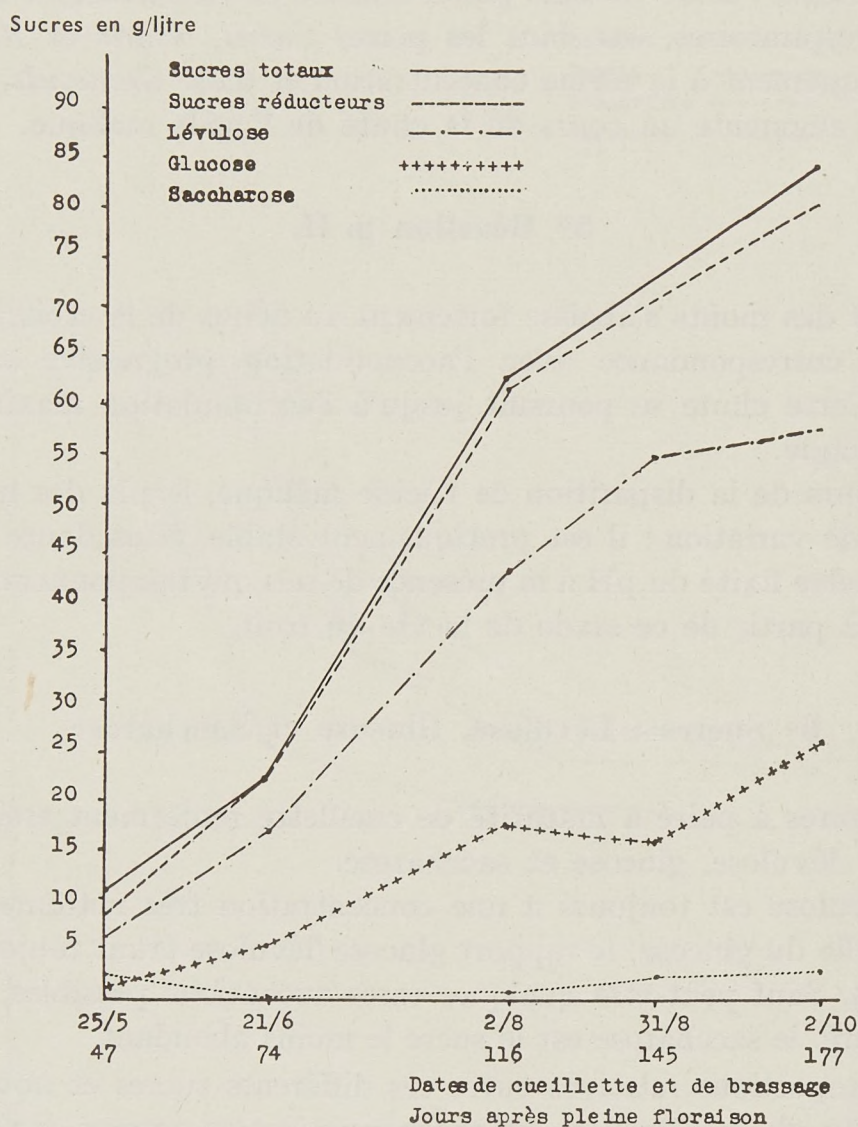
Dans le moût des jeunes poires *Carisi*, *Graneville*, *Souris*, 43 à 47 jours après la pleine floraison, nous avons trouvé du lévulose et du glucose, ce dernier en quantité inférieure au premier.

Par contre dans le moût des jeunes poires *Rousset*, brassées 25 jours après pleine floraison, nous n'avons pas décelé de glucose, le lévulose représentant seul les sucres réducteurs, le glucose apparaissant environ 25 jours plus tard. De petites quantités de saccharose, ne dépassant pas

la concentration de 2 g par litre paraissent exister déjà dans ces quatre variétés : nous faisons certaines réserves sur cette constatation, les lectures polarimétriques pouvant être légèrement faussées du fait de la difficulté d'obtenir des liquides parfaitement décolorés au sous-acétate de plomb avec les jus extraits de ces très jeunes fruits. Nous n'avons pra-

GRAPHIQUE VIII

CARISI



tiquement plus trouvé de saccharose dans les moûts préparés avec les poires en croissance, lors des prélèvements du 21 juin et du 2 août. ULRICH (6) a signalé cependant une diminution du saccharose, dans la poire Williams, au cours de la période s'étendant de la floraison à la mi-juillet. Peut-être en est-il de même ici ?

De la floraison à la maturité de cueillette de ces quatre poires à poiré, les sucres réducteurs s'accumulent d'une façon continue, le rapport glucose/lévulose augmente finalement ainsi qu'on peut le constater dans le tableau VII.

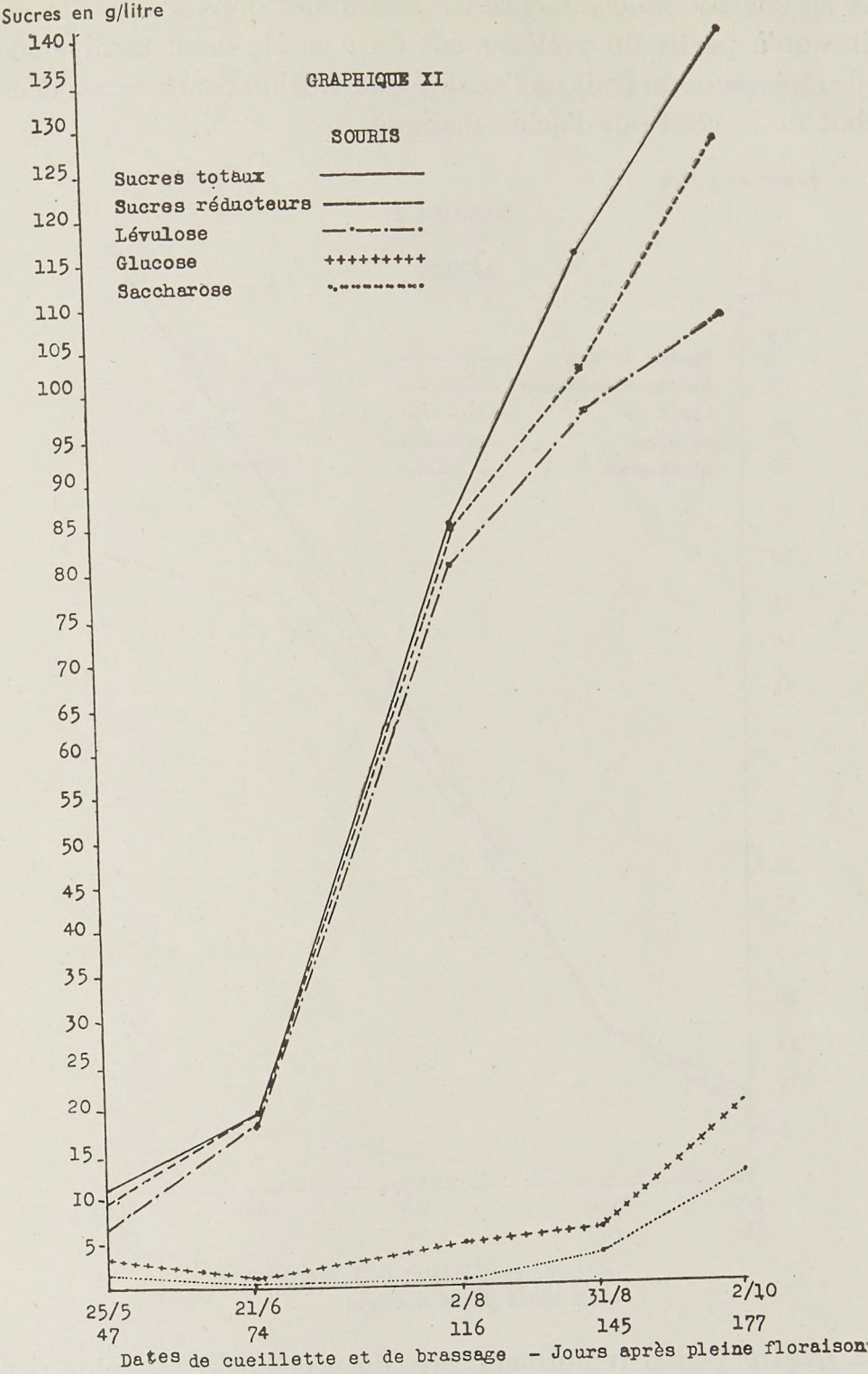


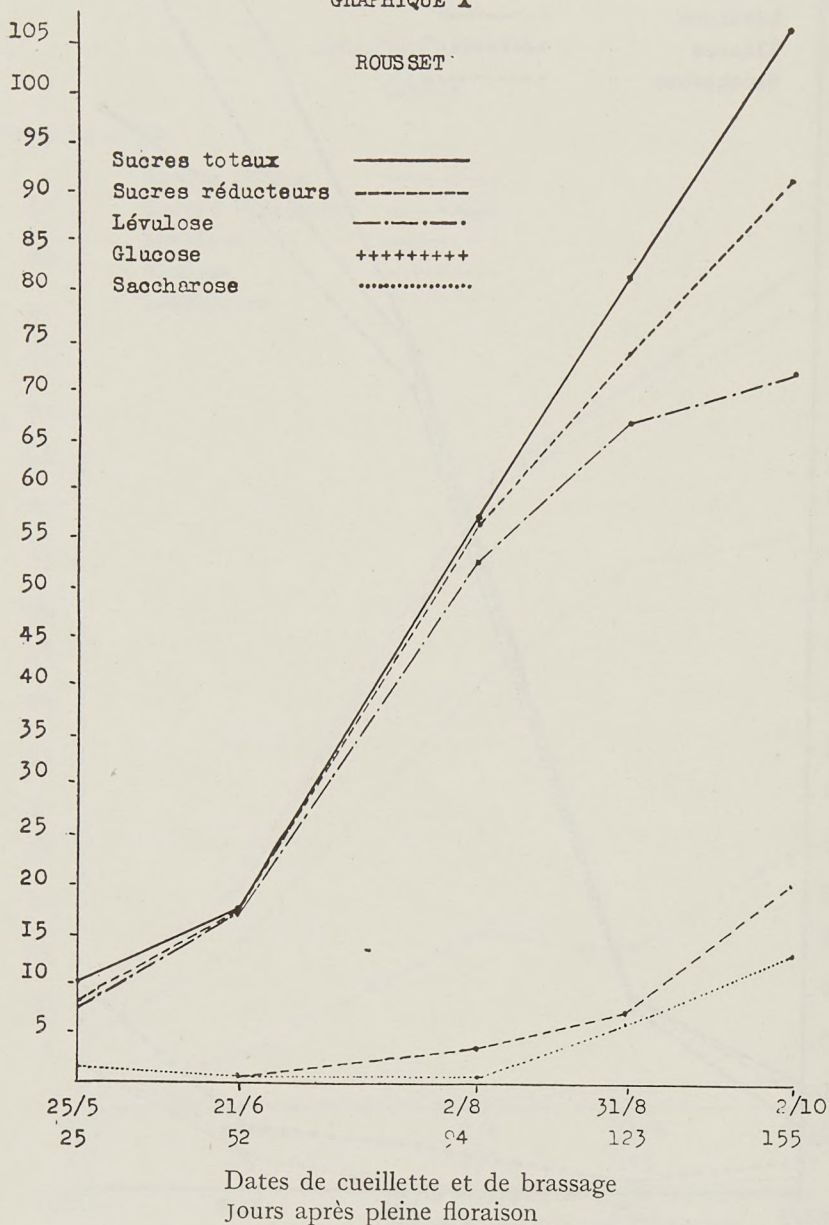
TABLEAU VII

Dates des prélèvements	25/5	21/6	2/8	31/8	2/10
Carisi :					
Sucres réducteurs g/l.....	8,57	22,10	62,8	73,75	84,4
Glucose/lévéulose	0,25	0,30	0,42	0,29	0,46
Souris :					
Sucres réducteurs g/l.....	10,5	19,6	85,2	102,9	127,9
Glucose/lévéulose	0,45 ?	0,065	0,057	0,061	0,184

Le saccharose ne commence à s'accumuler dans les quatre variétés de poires qu'à partir du prélèvement du 2 août, donc tardivement, au stade de croissance du fruit où l'acidité de titration commence à décroître, au début de la chute de l'acide malique.

Sucres en g/litre

GRAPHIQUE I



Ces quatre poires renferment peu de saccharose, la plus pauvre, *Carisi*, donne un moût ne renfermant que 3,9 g de saccharose et la plus riche, *Rousset* 12,1 g de saccharose, pour 100 g de sucres totaux.

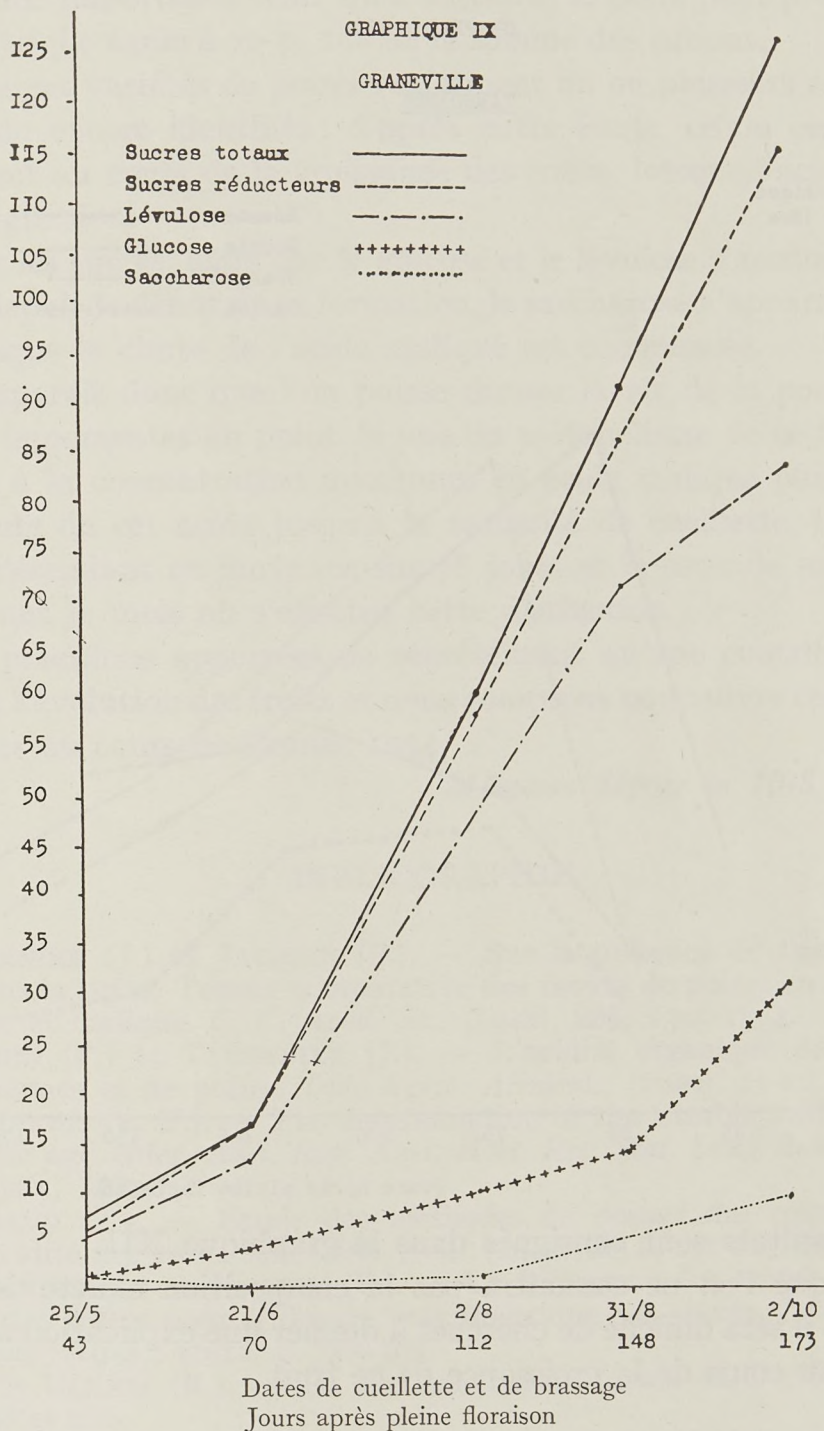
7° Tannoïdes

Nos dosages au permanganate de potasse suivant la méthode de LOEWENTHAL, en présence de carmin d'indigo, donnent les matières oxydables, dans les conditions du dosage c'est-à-dire les ortho et les

paradiphénols, d'après WILLIAMS (7) ; nous les avons exprimées en acide tannique.

Carisi est une variété peu astringente tandis que *Graneville*, *Souris* et surtout *Rousset* sont très astringentes.

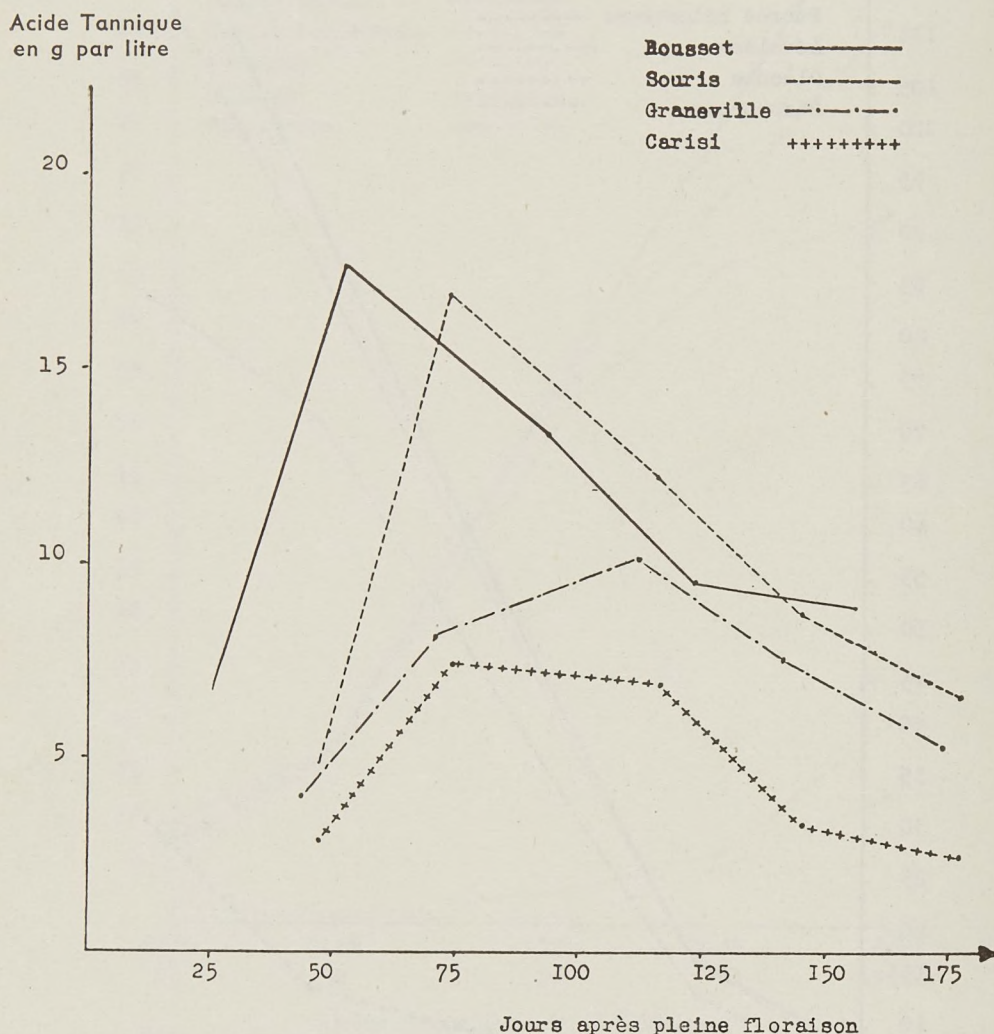
Sucres en g/litre



Les moûts des jeunes fruits, soit une quarantaine de jours après la floraison, sont déjà riches en tannoïdes. Ceux-ci s'accumulent encore dans le fruit, jusqu'à fin juin, notamment dans les variétés *Rousset* et *Souris*, dont les moûts renferment respectivement 17,6 g et 16,8 g de

tanin par litre. Puis au fur et à mesure que la poire se rapproche de sa maturité, la concentration en tannoïdes diminue dans les moûts, pour finalement retomber, à maturité, à une teneur se rapprochant de celle constatée dans les jus de poires en début de croissance, une quarantaine de jours après la pleine floraison.

GRAPHIQUE XII

TANNOÏDES

Ces résultats sont consignés dans le graphique XII.

Tant que l'on ne connaîtra pas la composition exacte des tanins de la poire, il sera difficile de chercher à donner une explication à la chute constatée au cours de la croissance de ce fruit.

III. — CONCLUSIONS

Cette première étude nous a permis d'apporter quelques précisions sur l'accumulation et les transformations des principaux constituants de la poire à poiré, au cours de sa croissance et de sa maturation sur l'arbre.

Cette étude a confirmé les variations importantes de la composition de l'acidité organique suivant les variétés de poires à poiré. L'étude du métabolisme de ces acides nous a permis de préciser que, chez les variétés riches en acide citrique, cet acide ne commence à s'accumuler dans les tissus que lorsque la chute de l'acide malique est commencée, cette chute prenant une importance telle, qu'à maturité la poire peut présenter une acidité citrique égale à 70 p. 100 de la somme des cations.

Certaines variétés de poires renferment un ou plusieurs acides organiques non encore identifiés : d'après notre étude, ce ou ces acides se formeraient au cours de la croissance des fruits, lorsque l'acide malique est en régression.

Pour les sucres, alors que le glucose et le lévulose s'accumulent dans le fruit, depuis le début de sa formation, le saccharose n'apparaît que plus tard, lorsque la chute de l'acide malique est commencée.

Il apparaît donc que l'on puisse diviser la vie de la poire en deux périodes importantes au point de vue du métabolisme de ce fruit : de la nouaison à la concentration maximum en acide malique puis du début de la chute de cet acide jusqu'à la maturité de cueillette, la première période s'étendant en moyenne sur 78 jours et la seconde sur 92 jours, juillet étant le mois où s'effectue cette distinction.

Ces précisions apportées ne représentent qu'une contribution bien minime à l'évolution des fruits et nous comptons poursuivre ces premières recherches au cours de l'année 1954.

Mémoire déposé le 10-3, 1954.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) TAVERNIER (J.) et JACQUIN (P.). — Sur la présence de l'acide citrique dans la poire. Teneur comparative des moûts de poires en acides citrique et malique. *C. C. Acad. Sc.*, (1948), **226**, 1393-1394.
 - (2) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — L'acidité organique des moûts de pommes et de poires. *Ind. Agric. Aliment.*, (1949), 11-12, 513-530.
 - (3) BURROUGHS (L. F.). — The determination of the titrable acidity of apple juice and cider. *Ann. Rep. Agri. Hort. Res. Stat. Long Ashton, Bristol*, (1946), **127**.
 - (4) PEYNAUD (E.). — Etude des méthodes de dosage des constituants de l'acidité des vins. *Ann. Chim. Anal.* (1946), **28**, 6, 111-117, **28**, 7, 127-135.
 - (5) TAVERNIER (J.) et JACQUIN (P.). — La défécation des moûts de pommes et des cidres pour le dosage polarimétrique des sucres. *Ind. Agri. Aliment.*, (1948), 10-12, p. 305-308.
 - (6) d'après ULRICH (R.). — La vie des fruits, Masson et C^{ie}, Paris (1952), 248 et 226.
 - (7) WILLIAMS (A. H.). — The tannin of apple juice and cider. An interpretation of the permanganate titration method. *Chem. Industr.*, (1953), **22**, 540-541.
-

TENEUR EN ACIDE ASCORBIQUE DES DIFFÉRENTES PARTIES DU RAISIN (Jus, pulpe, pellicule, rafle)

PAR

Mlle Andrée OURNAC

Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie,
la Cidrierie et les Jus de Fruits, Narbonne

Cette étude a été entreprise en vue de contribuer à une amélioration de l'industrie du jus de raisin, en essayant d'accroître, dans une certaine mesure, la connaissance de la matière première utilisée dans cette industrie : le raisin.

Une parfaite connaissance de la matière première permettra une utilisation plus rationnelle. La localisation de l'acide ascorbique à l'intérieur de la grappe de raisin a été recherchée et pour cela, le dosage de cet acide, dans les différents constituants du fruit : rafle, pellicule, pulpe et jus, a été effectué.

Les travaux antérieurs

Un certain nombre de travaux relatifs à la teneur du raisin en vitamine C ont été déjà effectués.

Nous allons passer en revue ces travaux, examiner surtout le protocole des essais et les méthodes de dosage utilisées, de manière à nous rendre compte de l'objectivité des résultats.

1^o M. GUERASSIMOFF et Mme WINOGRADAWA 1931 (1), dosent la vitamine C.

1 : dans le jus de raisin frais en cours de la maturation du fruit ;

2 : dans le jus de raisin au cours de fermentation et dans les vins.

Ils emploient pour le dosage la méthode colorimétrique de BEZSSONOFF qui permet uniquement la détermination de la forme réduite de la vitamine. Ils comparent la couleur donnée par les jus et les vins en présence du réactif, à celle donnée par un jus de tomate mûre qu'ils considèrent comme valeur 100 ; les auteurs estiment eux-mêmes que les chiffres qu'ils publient n'ont pas de valeur absolue. Pour eux, la richesse du jus en vitamine C augmente au fur et à mesure que le fruit mûrit et diminue dès que le fruit dépasse le stade de maturité. Ils remarquent ensuite que les vins

ayant fermenté avec les peaux et les rafles sont plus riches en facteur C que les moûts de départ et sont amenés ainsi à conclure que la vitamine C se trouve surtout dans les parties solides de la grappe. Ils arrivent à cette conclusion d'une façon indirecte, en utilisant une méthode très peu rigoureuse, et ne donnent aucun chiffre.

2° VENEZIA 1938 (2) dose la vitamine C :

1 : dans le jus de quelques variétés de raisin pendant le cycle de maturation ;

2 : dans le jus et dans les pellicules en fin de maturation ;

3 : dans les vins.

Il utilise la méthode iodométrique de BAGNOLESI et dose donc la vitamine à l'état réduit. Il note une augmentation du contenu vitaminique du jus de raisin au moment de la veraison suivie d'une diminution qui se produit vers la fin de la maturation.

Il trouve des doses importantes de vitamine C dans les pellicules, de 40 à 160 mg pour 100 g de matière humide, et constate que les jus ayant fermenté avec les pellicules donnent un vin d'une teneur en acide ascorbique supérieure à celle des vins obtenus par fermentation du jus seul.

3° GENEVOIS en 1938 (3) et L. GATET en 1939 (4), ont étudié au moyen de dosages chimiques, par réduction et par précipitation, la teneur du raisin en vitamine C au cours de la maturation du fruit. D'après GENEVOIS, l'acide ascorbique réduit tend vers 0 quand le raisin mûrit et l'acide ascorbique oxydé diminue sans disparaître entièrement.

4° Mme RANDOIN (L.) en 1939 (5), effectue des dosages biologiques et chimiques (méthode TILLMANS au dichlorophénol indophénol qui donne la vitamine à l'état réduit) de la vitamine C sur : le grain entier, le jus, la pulpe, et les pellicules. Elle en conclue que la vitamine est localisée en grande partie dans l'enveloppe du grain. Elle trouve dans la peau des raisins blancs 4 à 7,5 mg d'acide ascorbique pour 100 g de matière fraîche et 7,3 à 15 mg dans la peau des raisins noirs.

5° M. FLANZY (M.) et Mlle MICHAUX (A.) 1940 (6). Ces auteurs sont les premiers à s'intéresser à la rafle. Au moyen de dosage biologique ils classent les différents éléments du fruit selon leur valeur décroissante en facteur antiscorbutique, de la façon suivante : rafle, jus, pellicule.

6° LAVOLLAY (J) en 1947 (7) publie un tableau des vitamines contenues dans le raisin fruit entier et dans le jus, d'après les analyses effectuées par des auteurs étrangers. Voici les chiffres relatifs à la vitamine C.

jus frais — 0,6 à 9,6 mg/100 g ;

fruit — 0,7 à 10,7 mg/100 g.

Ces données peuvent s'interpréter ainsi : le fruit est plus riche en acide ascorbique que le jus. Cette interprétation n'est rigoureuse que si les différents auteurs ont utilisé les mêmes cépages et les mêmes méthodes de détermination.

Ces travaux qui ont été conduits de façons différentes et dont certains manquent de précision, aboutissent aux mêmes conclusions : la vitamine C se trouve en grande partie dans les constituants solides du fruit.

Travaux personnels

Cependant, nous avons voulu entreprendre une étude systématique de la teneur en acide ascorbique de tous les éléments constitutifs du raisin, sans oublier la rafle, pour laquelle les travaux précités ne donnent aucun chiffre. La teneur des pépins n'a pas été envisagée ici, étant donné leur faible poids par rapport à celui du fruit ; nous supposons, à première approximation, que leur apport en vitamine C peut être considéré comme négligeable.

Nous avons déterminé pour chaque élément : sa valeur intrinsèque en vitamine C et sa participation à la valeur vitaminique totale du fruit. Nous avons utilisé une méthode de dosage nous donnant la somme : acide ascorbique + acide déhydroascorbique, puisqu'il est établi que les deux formes, oxydée et réduite, de la vitamine C, possèdent vis-à-vis de l'organisme les mêmes propriétés physiologiques (8).

Préparation des échantillons

Le choix des cépages s'est porté sur des cépages rouges-aramon, carignan, morastel, grenache — et des cépages blancs-clairette, grenache macabeu, listan — que l'on trouve couramment dans notre région.

Dans deux cas (aramon et carignan) nous avons été amenés à utiliser des raisins avant le stade de complète maturité et à la complète maturité, dans tous les autres cas, les dosages ont été effectués sur des fruits pratiquement mûrs.

Les raisins de chaque lot étaient d'abord pesés, détachés de la rafle, puis pelés délicatement. On déterminait ensuite les poids respectifs des pellicules, pépins, rafles et de la pulpe.

Un poids déterminé de chaque constituant était coupé en menus morceaux puis traité dans un mortier par de l'acide métaphosphorique à 5 p. 100. On procédait par des épuisements successifs suivis de centrifugation et on portait les liquides d'extraction à un volume déterminé.

Dosage

Nous avons utilisé la méthode de ROE et OESTERLING adaptée par « the association of vitamin chemists Inc » (9). Elle est basée sur l'oxydation de l'acide ascorbique en dehydro, suivie d'une précipitation par la

2-4 dinitro phenyl hydrazine. La fin du dosage s'effectue au moyen d'un photolorimètre. Nous avons donné dans une publication antérieure (10) les raisons du choix de cette méthode et la manière dont nous opérons.

Résultats

Les résultats sont exprimés en mg de la somme : acide ascorbique + acide déhydroascorbique et sont groupés dans les tableaux I, II, III, IV.

La pulpe représente le grain privé des pépins et de la pellicule.

Nous donnons les résultats par 100 grains et par 100 g de chaque constituant frais.

Étant donné un kilo de raisin (grain + rafle), nous calculons la quantité de vitamine C fournie par chaque constituant.

Nous déterminons ensuite le pourcentage de vitamine apporté respectivement par chaque élément du fruit entier (grain + rafle). Tableau n° IV.

Interprétation des résultats

D'après la lecture des 3 tableaux nous pouvons énoncer les constatations suivantes :

1° les raisins blancs sont constitués par des éléments (rafle, pulpe, jus, pellicule) moins riches dans l'ensemble que ceux qui constituent les raisins rouges.

	mg de vitamine C pour 100 g de matière fraîche	
	raisins blancs	raisins rouges
Jus.....	3 à 5 %	4 à 8 %
Pulpe.....	4 à 6 %	5 à 8 %
Pellicule.....	13 à 50 %	25 à 60 %
Rafle	15 à 40 %	20 à 40 %

Cas des grenaches rouges et blancs du 1^{er} septembre (Tableaux I et II) :

— Au point de vue teneur du jus en vitamine C (rapporté au litre, au poids et au nombre de grains), les deux cépages sont sensiblement identiques ;

— c'est au point de vue teneur et apport en vitamine de la rafle et de la pellicule que ces 2 cépages sont différents, le rouge étant bien supérieur au blanc ;

2° le jus de raisin frais, constitué par le suc vacuolaire des cellules de la pulpe, contient entre 1/4 et 1/3 de la quantité de vitamine C que peut fournir le fruit entier (rafle, pellicule, et pulpe) ;

TABLEAU I

Raisins blancs ; acide ascorbique dans les différents constituants

	24 Août Hybride	28 Août Listan	1 ^{er} Sept. Grenache	1 ^{er} Sept. Macabeu	29 Sept. Clairette
Poids 100 grains (en g)	179	304	238	201	169
Sucre (en g/l)	152	181	234	204	199
Acidité totale (en g/l de SO ₄ H ₂)	8,1	2,6	5,1	3,7	2,2
Vitamine C en mg/l	33	50	46,6	50	53
<i>Par 100 g matière fraîche :</i>					
Jus	3,1	4,6	4,2	4,6	4,9
Pulpe	5,8	3,9	5	4,9	4,8
Pellicule	52,6	19,6	19,5	21,8	13,5
Rafle	17,6	27	23	19,5	36,4
<i>Par 100 grains :</i>					
Jus	4,5	8,2	8	7,7	6,4
Pulpe	10,2	11,1	10,8	8,3	8,3
Pellicule	11	5,6	7,5	6,1	3,9
Rafle	0,6	1,5	1,7	0,7	2,2
<i>Dans 1 000 g de raisins (rafle + grain) :</i>					
Jus	20,8	32,8	53	34,8	37
Pulpe	45,1	32,8	39,2	32,7	36,7
Pellicule	48	16,5	27,2	29,9	16,9
Rafle	3,3	4,8	6,9	3,4	12,8

TABLEAU II

Raisins rouges ; acide ascorbique dans les différents constituants

	Morastel 8 septembre	Aramon 17 août	Hybride 24 août	Grenache 1 ^{er} septembre
Poids 100 grains (en g)	267	288	128	234
Sucre (en g/l)	163	124	135	231
Acidité totale (en g/l de SO ₄ H ₂)	7	5	9,8	5
Vitamine C mg/l	61,5	52,5	64	45
<i>Par 100 g de matière fraîche :</i>				
Jus	5,7	4,9	6	4,1
Pulpe	7,6	5,1	4,9	4,8
Pellicule	45	38,2	31,4	34
Rafle	26,2	28,3	15,3	25
<i>Par 100 grains :</i>				
Jus	13	11	5,4	8,1
Pulpe	16	15,5	5,5	10,2
Pellicule	18,7	13,2	9,2	14,2
Rafle	1	2,2	0,5	3,1
<i>Dans 1 000 g de raisin (rafle + grains) :</i>				
Jus	42	37	42,3	32,7
Pulpe	59,4	43,8	32,2	35,1
Pellicule	69,4	37,1	53,3	48,8
Rafle	3,8	7,6	3,5	12,6

TABEAU III

Raisins rouges ; évolution de l'acide ascorbique au cours de la maturation

	Aramon 19 août	Aramon 14 septembre	Carignan 19 août	Carignan 21 septembre
<i>Poids 100 grains (en g)</i>	400	487	173	252
<i>Sucre (en g/l)</i>	130	170	137	211
<i>Acidité totale (en g/l de SO₄H₂)</i>	8,1	5	11	5,1
<i>Vitamine C mg/l</i>	60	45,7	86	72
<i>Par 100 g de matière fraîche :</i>				
<i>Jus</i>	5,7	4,2	8,1	7,2
<i>Pulpe</i>	5,4	4,7	5,8	5,6
<i>Pellicule</i>	22,3	25,5	33,5	57,1
<i>Rafle</i>	31	36,9	37,6	32,5
<i>Par 100 grains :</i>				
<i>Jus</i>	16,6	16	9,9	13
<i>Pulpe</i>	21	21	10,5	14,2
<i>Pellicule</i>	13	15	8,1	15
<i>Rafle</i>	3	2,6	1,3	1,2
<i>Dans 1 000 g de raisins (rafle + grains) :</i>				
<i>Jus</i>	40,5	32	56,3	52
<i>Pulpe</i>	45,4	42	49	55,4
<i>Pellicule</i>	27,2	30	36,2	60
<i>Rafle</i>	7,1	5,2	7,3	4,7

TABEAU IV

*Pourcentage de vitamine apporté par chaque élément.
Chaque élément participe à l'apport par le fruit de 100 mg de vitamine C
dans les proportions suivantes*

Cépages	Jus	Pulpe	Pellicule	Rafle
	Mg de vitamine C			
<i>Blancs :</i>				
<i>Hybride : 24 août</i>	17,7	38,4	41	2,8
<i>Listan : 28 août</i>	37,5	37,7	19	5,5
<i>Grenache : 1^{er} septembre</i>	31	36,8	25,6	6,4
<i>Macabeu : 1^{er} septembre</i>	36	32,4	25,2	3,3
<i>Clairette : 29 septembre</i>	35,8	35,4	16,3	12,3
<i>Rouges :</i>				
<i>Morastel : 8 septembre</i>	24,1	34,1	39,7	2,1
<i>Aramon : 17 août</i>	29,5	34,9	29,5	6
<i>Hybride : 24 août</i>	32,1	24,5	40,5	2,6
<i>Grenache : 1^{er} septembre</i>	25,3	27,1	37,9	9,7
<i>Aramon : 19 août</i>	33,7	37,7	22,6	5,9
<i>Aramon : 14 septembre</i>	29,3	38,4	27,4	4,7
<i>Carignan : 19 août</i>	37,8	32,9	24,3	4,93
<i>Carignan : 21 septembre</i>	30,10	31	35,4	2,6

3° dans les chiffres rapportés à 100 grains, la teneur de la pulpe est toujours supérieure à celle du jus, ce qui signifie, que par écrasement du grain, le jus qui s'écoule n'entraîne pas toute la vitamine contenue à l'intérieur du fruit ;

4° la pellicule constitue une grosse réserve de vitamine C, elle représente 15 à 40 p. 100 de la vitamine totale contenue dans le fruit entier.

5° la rafle contient des doses importantes de vitamine C, 15 à 40 mg pour 100 g de rafle fraîche.

Cependant étant donné la faiblesse du rapport :

$$\frac{\text{poids de rafle fraîche}}{\text{poids de grain de raisin frais}}$$

rapport qui varie dans nos essais, de $\frac{1,5}{100}$ à $\frac{3,5}{100}$, l'apport de cet élément en vitamine est très faible. La rafle est tout de même légèrement moins riche en valeur vitaminique absolue que la pellicule ;

6° le classement des éléments constitutifs du raisin mûr rouge ou blanc, en valeur absolue vitaminique décroissante, est le suivant :

pellicule-rafle-pulpe-jus ;

7° le classement de ces mêmes éléments en fonction de leur apport en vitamine C pour un poids déterminé de fruit entier, est moins évident. Cet apport varie pour chaque cépage et dépend de deux facteurs :

- la richesse intrinsèque de chaque élément ;
- le rapport existant entre le poids de l'élément et le poids du fruit entier.

Cet apport peut tout de même différencier les raisins rouges des raisins blancs d'après nos résultats.

Cas des raisins blancs : l'apport de la pulpe est supérieur à celui de la pellicule.

Cas des raisins rouges : l'apport de la pellicule est supérieur à celui de la pulpe.

Dans tous les cas examinés l'apport de la rafle est le plus faible.

Évolution au cours de la maturation (tableau III)

Cette évolution peut être suivie sur les cépages aramon et carignan. Les raisins du 1^{er} prélèvement étaient incomplètement mûrs, tandis que ceux du 2^e avaient atteint le stade de maturité industrielle.

On constate alors :

- une nette diminution de la teneur au litre, qui est en partie expliquée par le grossissement des grains dû à une dilution des substances se trouvant à l'intérieur ;

- une diminution de la teneur du jus en valeur absolue ;
- une diminution de l'apport de vitamine par la rafle ;
- une augmentation de la richesse absolue de la pellicule et de son apport rapporté au nombre et au poids des grains.

Étant donné la faiblesse du nombre des essais, aucune conclusion définitive ne peut être établie.

Il est simplement permis d'énoncer que, d'après les deux cas envisagés il semble que la maturation ait comme conséquence sur la teneur en vitamine C du raisin :

- une diminution dans le jus et la rafle ;
- une augmentation dans la pellicule.

Conclusion

Cette étude nous montre que l'on ne doit pas apprécier le fruit uniquement à travers le jus obtenu par simple déchirement des cellules de la pulpe.

Elle pourrait orienter l'industrie des jus de raisin vers une voie permettant de transposer la vitamine C, des parties solides du fruit, dans le jus et de la préserver d'une destruction pouvant se produire soit au cours de la préparation soit au cours de la conservation du jus. C'est ce que permettrait de réaliser la technique de la préparation du jus qui consiste en une macération plus ou moins prolongée, en présence d'anhydride sulfureux, du jus au contact des éléments solides du fruit.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) GUERASSIMOFF (M.) et WINOGRADOWA (N.). — La vitamine C dans le jus de raisin et dans le vin ; travaux de la station expérimentale uvale et vinicole de Crimée, Fascicule 3, Valta 1931.
- (2) VENEZIA (M.). — Sull'acido ascorbico (vitamina C) nell'uva e nel vino-R-Stazione sperimentale di viticoltura di enologia. *Conegliano-Annuario*, volume VIII, page 67, 1937-1938.
- (3) GENEVOIS (L.). — Les substances réductrices au cours de la maturation du raisin. *Bull. Sté Chimique de France*, **5**, p. 579, 1938.
- (4) GATET (Mlle L.). — Recherches biochimiques sur la maturation des fruits. *Annales de physiologie*, XV, p. 984, 1939.
- (5) RANDOIN (Mme L.). — Recherches sur la valeur alimentaire des jus de raisin frais et des vins, au point de vue de leur teneur en vitamines. *Bull. int. du vin*, **3**, p. 62, 1934. — Etude comparative, au point de vue des vitamines hydrosolubles de la valeur nutritive du raisin blanc et du raisin noir. *Bull. int. du vin*, **12**, p. 69, 1939.
- (6) FLANZY (M.) et MICHAUX (Mlle A.). — Travaux non publiés. Recherches sur la composition du raisin. n° 1 : Présence et répartition de la vitamine antiscorbutique. — n° 2 : Nouvelles recherches sur la présence et la répartition de la vitamine antiscorbutique dans les raisins. Influence de l'anhydride sulfureux sur la vitamine présente dans les rafles, 1940.

- (7) LAVOLLAY (J.) et PATRON (A.). — Les jus de fruits. Composition et fabrication. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, **1**, 315, 1947.
 - (8) BEZSSONOFF. — Sur l'identification de la vitamine C. *Bull. Sté de Chimie biologique*, **16**, 1110, 1934.
 - (9) Methods of vitamin assay, 1947, p. 159, Prepared and edited by the association of vitamin chemist, Inc. Interscience publishers Inc. New-York, Interscience publishers Ltd. London.
 - (10) OURNAC (Mlle A.). — Recherches sur la variation de la teneur en acide ascorbique et en facteur P du jus de raisin en fonction de son mode de préparation. *Annales de technologie de l'I. N. R. A.*, p. 99, 1953.
-

COMPOSITION ET EMPLOI DES VINS CONCENTRÉS PAR LE FROID A FORT DEGRÉ ALCOOLIQUE

PAR

P. JAULMES (Professeur) et **Mlle G. HAMELLE** (Assistante)

Faculté de Pharmacie de Montpellier

PLAN DU MÉMOIRE

- I. — Introduction.
- II. — Action de la concentration par le froid sur la composition des vins.
 - 1° Les résultats.
 - 2° Discussion des résultats.
 - a) Limites de la concentration par le froid.
 - b) Avantages du vin concentré 20-22° sur le vin normal.
 - c) Inconvénients du vin concentré à 20-22°.
- III. — Comparaison entre le vin concentré par le froid et les autres produits viniques de même ordre.
 - 1° Comparaison avec les vins vinés.
 - 2° Comparaison avec les vins concentrés par la chaleur.
- IV. — Contrôle de la qualité d'un vin concentré.
- V. — Emplois du vin concentré.
- VI. — Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

La législation française sur les vins est traditionnellement très stricte et particulièrement sévère sur la nature des traitements chimiques et physiques que peuvent subir les vins, de manière à ce que ce produit conserve son caractère de boisson naturelle et de produit pur. Les produits inoffensifs qui peuvent être employés sont réduits à un très petit nombre et en quantité limitée. Les traitements physiques auxquels on peut légalement soumettre un vin sont eux aussi très peu nombreux et ne peuvent modifier notablement la composition du vin, coupage, aération, soutirage, filtration, collage etc... La congélation partielle du vin en vue de sa concentration est une opération licite à

la condition que le volume du vin ne soit pas réduit de plus du quart et que l'enrichissement en alcool ne dépasse jamais 205.

De cette manière on a pu éviter que les trop mauvais vins ne soient transformés en vins de fort degré de composition anormale et ainsi ces vins ne peuvent porter de préjudice commercial aux vins naturellement de bonne qualité et de fort degré.

Il est pourtant théoriquement très facile de dépasser beaucoup ce taux limite de concentration des trois quarts et les produits ainsi obtenus, s'ils ne sont plus des vins au sens légal du mot peuvent être des produits de bonne qualité, qui sont employés pour la fabrication des vins apéritifs ; cette fabrication fut même réalisée sur une assez grande échelle et avec succès entre 1940 et 1945 à une époque où l'alcool de vinage était rare.

Mais c'est dans un tout autre but que depuis sept ans d'importants volumes de vin ont été concentrés par le froid de manière à amener le degré alcoolique au-dessus de 20°. Un tel concentré a été transporté dans les territoires français d'outre-mer pour l'alimentation de la troupe et ainsi a été réalisée à l'échelle industrielle une expérience très instructive. Les expéditions françaises dans les régions circonpolaires ont, elles aussi, utilisé ce produit d'une façon habituelle dans leur alimentation et en ont été très satisfaites.

On peut donc examiner maintenant les enseignements que l'on peut tirer des observations qui ont été faites et étudier les emplois auxquels on pourrait destiner un vin aussi fortement concentré, si sa fabrication et sa mise en vente pouvaient être autorisées dans le secteur civil.

Nous n'étudierons pour notre part que la répercussion de la concentration sur la composition du vin, le contrôle de cette opération et les avantages et les inconvénients que présente un pareil concentré par rapport au vin ordinaire.

II. — ACTION DE LA CONCENTRATION SUR LA COMPOSITION DES VINS

1° Les résultats

Sous l'action du froid une partie de l'eau est transformée en cristaux de glace ; par compression dans un extracteur à piston ou par centrifugation, on sépare les phases solide et liquide autant qu'il est possible de le faire. Suivons le sort des divers constituants du vin dans cette opération réalisée dans un appareil Daubron (essorage de la glace par compression). Nous partons d'un vin initial de 1207 nous obtenons du vin concentré de 2008 et de la glace qui est destinée à être rejetée. La composition de ces trois fractions est la suivante :

TABEAU I

	Vin initial	Glace fondue	Vin concentré	<i>c</i> <i>i</i>	Vin concentré corrigé (1)	R
Volume en litres	1,678	0,678	1	1,68		1,68
Densité à 15°	0,9943	0,9994	0,9921			
Degré alcoolique.....	12°7	0°755	20°8	1,64	20°8	1,64
Extrait à 100°	27,15	1,5	43,0	1,59	46,11	1,69
Cendres.....	1,80	0,10	2,05	1,14	3,19	1,77
Alcalinité des cendres :						
En CO ₃ K ₂	1,26	0,05	1,02	0,81	2,16	1,71
En tartre	3,44	0,14	2,78	0,81	5,89	1,71
Sucres	1,13		1,9	1,68	1,9	1,68
Sulfates en SO ₄ K ₂	0,31		0,57	1,84	0,57	1,84
Chlorures en ClNa	0,10		0,165	1,65	0,165	1,65
Acidité totale en SO ₄ H ₂ ..	4,90	0,34	7,32	1,49	8,13	1,66
Acidité volatile en SO ₄ H ₂ ..	0,52	0,073	0,84	1,62	0,84	1,62
Acidité fixe en SO ₄ H ₂ ...	4,38	0,207	6,48	1,48	7,29	1,66
Acide tartrique total en tartre	4,32	0,36	3,95	0,91	7,06	1,64
Potasse totale en tartre ..	4,04	0,46	3,56	0,88	6,67	1,65
Anhydride sulfureux	0,086		0,097	1,13	0,097	1,13

(1) Par addition de 3,11 g de tartrate acide de potassium par litre.

L'examen de ces chiffres montre que la glace entraîne un peu de vin plus ou moins concentré. Un litre d'eau de fusion de la glace contient une quantité de vin entraînée, qui exprimée en volume de vin concentré s'élève à 36,5 ml. Comme il est plus logique de rapporter l'opération au litre de vin concentré obtenu, cette perte dans la glace s'élève à 24 ml de vin concentré. Nous pouvons noter que cette glace contient un peu plus de tartre qu'il n'y en a dans la quantité de vin qui s'y trouve, mais cette surcharge est très faible puisqu'elle n'atteint que 0,22 g d'après l'acide tartrique et 0,33 g d'après la potasse totale (soit 0,27 g de tartre en moyenne). Il ne s'est donc précipité qu'une très faible quantité de tartre pendant l'opération qui est très courte. Le vin concentré qui sort de l'appareil est pourtant très trouble et le dépôt du tartre insolubilisé se produit lorsque le vin arrive dans le récipient où on l'entrepone. On trouve en effet après quelques heures de repos au fond de celui-ci un dépôt important constitué essentiellement par du tartrate acide de potassium. Dans l'expérience que nous relatons cette quantité s'est élevée à 2,80 g par litre de vin concentré. L'augmentation du titre alcoolique diminue la solubilité de ce sel, mais sa précipitation n'est pas instantanée ou tout au moins les cristaux obtenus sont encore assez petits pour passer au travers des parois du cryoextracteur.

Les pertes de vin dans la glace se sont élevées dans cette expérience à 2,4 % du vin mis en œuvre, mais dans la pratique industrielle il faut prévoir des pertes bien plus élevées : pertes dans la filtration préalable et surtout au moment de la décantation du vin concentré qu'il faut séparer

des lies tartriques, séparation dont il n'a pas été tenu compte dans notre expérience. On estime que dans la pratique le total des pertes de toutes natures s'élève à 1,2-1,3 % par degré d'élévation du degré alcoolique.

Dans l'exemple ci-dessus, ces pertes totales s'élèvent à (20,8-12,7) 0,013 = 0,105 soit 10,5 %.

Cette perte du vin mis en œuvre et la précipitation ultérieure du tartrate acide de potassium sont-ils les deux seuls phénomènes observés?

Oui, mais en première approximation seulement.

Pour le mettre en évidence, nous allons calculer pour les divers éléments du vin mis en œuvre le rapport c/i = concentration dans le vin concentré/concentration dans le vin initial. Nous obtenons les valeurs variables pour ce rapport inscrites dans la quatrième colonne du tableau I. Il n'est pas étonnant que ce nombre soit variable, puisque du tartre s'est précipité. Corrigions donc la composition du vin concentré en ajoutant le poids du tartre précipité à l'extrait, à l'acide tartrique et à la potasse, le poids de carbonate de potassium correspondant à ce tartre aux cendres et à leur alcalinité, enfin l'acidité de ce tartre aux acidités totale et fixe. Mais il faut d'abord calculer la quantité de tartre précipité pendant et après la concentration. Dans le cas présent nous pouvons faire ce calcul de deux façons :

1° Ajoutons au tartre précipité après la concentration, celui qui s'est trouvé en surcharge dans la glace, nous obtenons ainsi le tartre qui a été soustrait au produit final.

$$2,80 + 0,27 = 3,07.$$

2° Calculons les quantités d'acide tartrique et de potasse totales qui devraient se trouver dans le vin concentré si aucune précipitation ne s'était produite. Pour cela multiplions acide tartrique et potasse du vin initial par le rapport de concentration R établi d'après l'augmentation du degré alcoolique.

$$R = 20,8/12,7 = 1,64$$

L'acide tartrique théorique du vin concentré est donc :

$$4,32 \cdot 1,64 = 7,10$$

tandis que la potasse théorique est de :

$$4,04 \cdot 1,64 = 6,63.$$

Or dans le vin concentré il n'y a que 3,95 d'acide tartrique et 3,56 de potasse totale. Il s'est donc précipité une quantité de tartrate acide de potassium qui est de 3,15 d'après l'acide tartrique et de 3,07 d'après la potasse soit 3,11 en moyenne. Cette manière de calculer est simple et commode, car elle ne nécessite pas la connaissance de la quantité et de la composition de la glace, ni la connaissance de la quantité de tartre recueillie au fond des cuves où le vin concentré est recueilli.

La composition du vin concentré peut alors être corrigée comme nous l'avons indiqué plus haut. Nous obtenons ainsi la composition corrigée indiquée dans la colonne 5 et à partir de cette composition corrigée nous calculons les rapports R. On observe la fixité de ce rapport aux erreurs de mesure près, ce qui prouve que la précipitation du tartre est bien le principal phénomène observé comme conséquence de la concentration et l'élimination d'une partie de l'eau.

Nous pouvons pourtant noter que le rapport R de l'anhydride sulfureux est inférieur au rapport R de l'alcool, tandis que le rapport R des sulfates est supérieur. Cette observation à peu près constante est la preuve chimique de l'oxydation marquée du vin. La madérisation ou tout au moins le vieillissement brusque-constamment observé gustativement sur le vin concentré est une autre preuve de cette oxydation. On devait s'attendre à cette dernière, car l'air est en contact avec le vin refroidi en couche mince au moment de l'essorage ⁽¹⁾ et pendant les manipulations qui suivent. Or ce vin très froid, fortement alcoolisé, dissout l'air beaucoup mieux que le vin ordinaire à la température ordinaire. Ces conditions sont optima pour l'oxydation de tous les produits réducteurs du vin. Cette oxydation marquée est le deuxième phénomène accessoire observé au cours de la concentration. Alors que la précipitation du tartre est inévitable, cette oxydation pourrait facilement être évitée ou diminuée, si on le voulait, en opérant à l'abri de l'air.

Ces observations faites au cours de l'opération industrielle expérimentale ont été confirmées par de nombreuses analyses faites sur les vins initiaux et les vins concentrés obtenus dans des opérations industrielles portant sur des quantités de 1 000 à 2 000 hl de concentrés et dont quelques analyses sont données plus bas à titre d'exemple. (Tableaux).

Une autre confirmation de ce que nous venons de dire se trouve dans l'analyse du dépôt qui s'accumule au fond des cuves où l'on reçoit le vin concentré au fur et à mesure de sa production. Les bourbes qui s'accumulent sont essorées au filtre presse et l'on obtient ainsi une matière solide dont la composition est la suivante :

Aspect	lie pressée
Couleur	lie de vin
Humidité après dessiccation à l'air	2,7 %
Cendres	30,1 %
Alcalinité des cendres en CO_3K_2	33,1 %
en tartre	90,2 %
Acidité à la phénolphthaléine (exprimée en crème de tartre)	84,6 %
Acide tartrique total (en crème de tartre)	84,7 %
Potasse totale (en crème de tartre)	88,2 %
Azote total	0,24 %
Matières azotées déduites	1,65 %
Sulfates en SO_4	0,81 %
Calcium en Ca	0,27 %
Tannins (Nègre)	1,25 %
Fer	0,39 %

⁽¹⁾ A ce point de vue l'essorage par compression paraît préférable à l'essorage par centrifugation, car il expose beaucoup moins le vin au contact de l'air.

TABLEAU II

	Vin initial	Vin concentré	Vin concentré corrigé ⁽¹⁾	R
Densité à 15°	0,9963	0,9925		
Degré alcoolique	11,1	21,4	21,4	1,93
Extrait à 100°	24,3	43,3	47,52	1,96
Cendres	2,47	3,35	4,90	1,98
Alcalinité :				
En CO_3K_2	1,69	1,75	3,27	1,94
En tartre	4,61	1,70	8,92	1,94
Sucres	1,72	3,17	3,17	1,84
Sulfates en SO_4K_2	0,66	1,45	1,45	2,20
Chlorures en ClNa	0,37	0,73	0,73	1,97
Acidité totale en SO_4H_2	4,20	7,04	8,14	1,94
Acidité volatile en SO_4H_2	0,58	1,10	1,10	1,90
Acidité fixe en SO_4H_2	3,67	5,94	7,04	1,94
Acide tartrique total en tartre ..	4,04	3,54	7,76	1,92
Potasse totale en tartre	4,65	4,76	8,98	1,93
Anhydride sulfureux en SO_2	0,133	0,182	0,182	1,37

⁽¹⁾ Par addition de 4,22 g de tartrate acide de potassium par litre.

TABLEAU III

	Vin initial	Vin concentré	Vin concentré corrigé ⁽¹⁾	R
Densité à 15°	0,9947	0,9896		
Degré alcoolique	12	21,3	21,3	1,78
Extrait à 100°	23,85	37,83	42,88	1,80
Cendres	1,95	2,18	4,03	2,07
Alcalinité :				
En CO_3K_2	1,72	1,00	2,84	1,65
En tartre	4,70	2,72	7,75	1,65
Sucres	1,55	2,10	2,10	1,58
Sulfates en SO_4K_2	0,28	0,615	0,615	2,30
Chlorures en ClNa	0,12	0,21	0,21	1,75
Acidité totale en SO_4H_2	4,13	6,10	7,41	1,79
Acidité volatile en SO_4H_2	0,37	0,68	0,68	1,84
Acidité fixe en SO_4H_2	3,76	5,42	6,73	1,79
Acide tartrique total en tartre ..	4,18	2,35	7,38	1,76
Potasse totale en tartre	4,61	3,15	8,18	1,77
Anhydride sulfureux en SO_2	0,065	0,083	0,083	1,27

⁽¹⁾ Par addition de 5,03 g de tartrate acide de potassium par litre.

TABLEAU IV

	Vin initial	Vin concentré	Vin concentré corrigé ⁽¹⁾	R
Densité à 15°	0,9947	0,9904		
Degré alcoolique	11,9	21,35	21,35	1,79
Extrait à 100°	24,71	38,00	42,23	1,71
Cendres	1,98	2,29	3,84	1,94
Alcalinité :				
En CO ₃ K ₂	1,62	1,65	3,20	1,97
En tartre	1,41	4,49	8,72	1,97
Sucres	1,51	2,60	2,60	1,72
Sulfates en SO ₄ K ₂	0,43	1,00	1,00	2,32
Chlorures en ClNa	0,082	0,145	0,145	1,77
Acidité totale en SO ₄ H ₂	4,35	6,62	7,72	1,77
Acidité volatile en SO ₄ H ₂	0,41	0,73	0,73	1,78
Acidité fixe en SO ₄ H ₂	3,94	5,89	6,99	1,77
Acide tartrique total en tartre ..	3,85	2,76	6,99	1,82
Potasse totale en tartre	4,51	3,77	8,00	1,77
Anhydride sulfureux en SO ₂	0,048	0,045	0,045	0,93

⁽¹⁾ Par addition de 4.23 g de tartrate acide de potassium par litre,

TABLEAU V

	Vin initial	Vin concentré	Vin concentré corrigé ⁽¹⁾	R
Densité à 15°	0,9947	0,9909		
Degré alcoolique	11,5	21,4		1,86
Extrait à 100°	24,15	41,33	45,99	1,90
Cendres	1,88	2,17	3,88	2,06
Alcalinité :				
En CO ₃ K ₂	1,73	1,61	3,32	1,92
En tartre	4,72	4,39	9,05	1,92
Sucres	1,48	2,8	2,8	1,88
Sulfates en SO ₄ K ₂	0,39	0,87	0,87	2,23
Chlorures en ClNa	0,063	0,120	0,120	1,91
Acidité totale en SO ₄ H ₂	4,35	7,14	8,34	1,91
Acidité voltaile en SO ₄ H ₂	0,30	0,59	0,59	1,97
Acidité fixe en SO ₄ H ₂	4,05	6,55	7,75	1,91
Acide tartrique total en tartre ..	4,39	3,55	8,21	1,87
Potasse totale en tartre	4,50	3,07	8,33	1,86
Anhydride sulfureux	0,138	0,168	0,168	1,22

⁽¹⁾ Par addition de 4,66 g de tartrate acide de potassium par litre.

TABLEAU VI

	Vin initial	Vin concentré	Vin concentré corrigé (1)	R
Densité à 15°	0,9947	0,9906		
Degré alcoolique	11,5	21,2		1,84
Extrait à 100°	24,15	39,6	44,2	1,83
Cendres	1,88	2,07	3,76	2,00
Alcalinité :				
En CO ₃ K ₂	1,73	1,61	3,30	1,91
En tartre	4,72	4,38	8,98	1,91
Sucres	1,48	2,90	2,90	1,96
Sulfates en SO ₄ K ₂	0,39	0,93	0,93	2,38
Chlorures en ClNa	0,063	0,112	0,112	1,80
Acidité totale en SO ₄ H ₂	4,35	6,95	8,15	1,87
Acidité volatile en SO ₄ H ₂	0,30	0,57	0,57	1,90
Acidité fixe en SO ₄ H ₂	4,05	6,38	7,58	1,87
Acide tartrique total en tartre ..	4,39	3,48	8,08	1,84
Potasse totale en tartre	4,50	3,65	8,25	1,83
Anhydride sulfureux en SO ₂	0,138	0,138	0,138	1,00

(1) Par addition de 4,6 g de tartrate acide de potassium par litre.

TABLEAU VII

	Vin initial	Vin concentré	Vin concentré corrigé (1)	R
Densité	0,9965	0,9925		
Degré alcoolique	11,2	21,0		1,88
Extrait	25,04	42,9	47,21	1,88
Cendres	1,89	2,31	3,90	2,06
Alcalinité :				
En CO ₃ K ₂	1,67	1,26	2,85	1,71
En tartre	4,54	3,44	7,75	1,71
Sucres	1,71	3,1	3,1	1,81
Sulfates en SO ₄ K ₂	0,351	0,81	0,81	2,31
Chlorures en ClNa	0,77	0,139	0,139	1,80
Acidité totale en SO ₄ H ₂	4,47	7,58	8,70	1,94
Acidité volatile en SO ₄ H ₂	0,49	0,91	0,89	1,86
Acidité fixe en SO ₄ H ₂	3,98	6,67	7,81	1,96
Acide tartrique total en tartre ..	4,86	3,92	8,23	1,93
Potasse totale en tartre	4,36	3,58	7,89	1,91
Anhydride sulfureux en SO ₂	0,121	0,152	0,152	1,25

(1) Par addition de 4,31 g de tartrate acide de potassium par litre.

Comme on le voit, ce dépôt est essentiellement constitué de tartrate acide de potassium. Sa richesse en fer montre que par oxydation, tout le fer précipitable a été éliminé dans ce dépôt. Le vin concentré est ainsi stabilisé.

Une autre modification apportée secondairement à la composition du vin par la concentration est l'*estérification* plus importante de l'alcool et des acides pendant sa conservation. On peut estimer que la teneur en esters doit être de deux à trois fois plus grande dans un tel vin que dans le vin initial conservé le même temps. Nous ne pouvons pas apporter encore de résultats analytiques sur ce phénomène. En même temps on doit observer une légère diminution du degré alcoolique et de l'acidité.

2^o Discussion des résultats

a) Limite de la concentration par le froid

Plus le degré alcoolique sera élevé, plus la perte de vin dans la glace sera forte, plus l'opération sera onéreuse et plus la perte de tartre sera grande. Déjà à 20-22° la moitié du tartre est éliminée et il n'en reste pratiquement plus si le degré alcoolique était porté au delà de 50°. Mais par contre l'économie sur le transport et le volume des récipients sera d'autant plus grande que la concentration sera plus forte. L'inconvénient majeur d'une trop forte concentration est cette perte de tartre qui est un élément important de la valeur alimentaire du vin. La perte de tartre de 50 % à 21° est déjà forte, et à ce point de vue il y aurait intérêt à concentrer à un degré moindre. Pourtant étant donné que l'intérêt principal d'un degré élevé est l'inaltérabilité que ce dernier confère au produit obtenu il importe d'atteindre un degré suffisant pour qu'on obtienne cette propriété et ce minimum est 17 à 18°. Il faut donc rester entre 18 et 25°, et 20 à 22° sont probablement les degrés optima.

b) Avantages du vin concentré 20-22° sur le vin normal

L'avantage principal, nous venons de le dire, est l'inaltérabilité. Ce produit est aussi stable qu'un spiritueux. Il peut rester indéfiniment en vidange sans que mycoderme aceti ou vini n'apparaissent à sa surface, il ne peut plus être atteint de la tourne. Ayant été fortement dépouillé par le froid, il ne se trouble pas et ne casse pas, aussi son aspect est toujours limpide et sa saveur toujours la même. Ces propriétés remarquables permettraient d'offrir à un prix très bas un vin de qualité certaine qui pourrait après coupage avec de l'eau servir de boisson courante au lieu et place du vin ordinaire dont le transport et le stockage demandent tant de soins et présentent tant d'aléas. Un pareil vin résiste très bien aux

climats les plus chauds comme aux températures les plus basses. Il commence en effet à se congeler à -11° et devient solide à -16° seulement, tandis qu'un vin de 10° commence à se congeler à $-3^{\circ}5$.

La réduction du volume permet une économie de 50 % sur les frais de transport et de contenant pour le stockage et le transport. L'économie qui en résulte est souvent supérieure aux frais et aux pertes de l'opération de congélation ⁽¹⁾.

c) Inconvénients du vin concentré à $20-21^{\circ}$

1^o Au point de vue gustatif, le vin concentré, stocké ou non, dilué avec le volume d'eau ramenant le degré alcoolique à sa valeur initiale, n'a pas la même saveur qu'initialement. Le vin a acquis un vieillissement rapide pouvant aller jusqu'à une madérisation excessive. Cet inconvénient ne doit pas être surestimé. Tout d'abord ce vieillissement rapide améliore beaucoup de vins et s'il n'est pas excessif il peut se traduire au contraire par une augmentation de la qualité du produit. Au surplus ce vieillissement pourrait être réglé à volonté en évitant plus ou moins complètement l'oxydation pendant l'opération de concentration. Il y aurait intérêt comme je l'ai déjà dit à opérer à l'abri de l'air soit en atmosphère d'azote, soit en atmosphère de gaz carbonique. Il y aurait intérêt à saturer préalablement le vin initial de gaz carbonique et à opérer au sein même de ce gaz. Plus simplement, un sulfitage judicieux avant la concentration pourrait notablement diminuer l'oxydation du vin.

D'ailleurs il ne faut pas espérer faire un bon vin concentré avec un mauvais vin initial. Le choix de la matière première est très important. Lorsqu'on désire obtenir un vin de consommation courante, il faut choisir des vins fruités, ayant une acidité fixe suffisante pour qu'après le dépôt de la moitié du tartre il reste une fraîcheur satisfaisante au vin concentré. Il faut pourtant éviter les vins trop acides, car après la concentration

(1) M. le Professeur BRÉMOND qui a étudié dans son laboratoire et dans la belle cave expérimentale de l'École Nationale d'Agriculture de Maison Carrée la concentration des vins par le froid a fait des observations semblables aux nôtres sur la concentration des divers éléments du vin, sur la précipitation du tartrate acide de potassium. Il conclut lui aussi à l'intérêt que présentent ces vins de 20 à 22° dont l'inaltérabilité et le plus faible volume permettent le transport au loin et le stockage à moindre frais. Nous le remercions d'avoir bien voulu nous communiquer ses résultats analytiques, plus complets que les nôtres, et son rapport à l'Institut Technique du Vin de juillet 1952 (1).

Le présent article était rédigé depuis longtemps, lorsque nous avons reçu la brochure intitulée : *Les problèmes actuels du vin*, éditée par l'Association des Anciens élèves de l'Institut Agricole d'Algérie (2). Ce recueil contient l'intéressante communication de M. BOUJAREL sur la concentration par le froid suivie de l'intervention de M. ROUBERT dont les conclusions se rapprochent beaucoup des nôtres.

Presque simultanément nous avons également lu la note de M. FLANZY, M^{me} OURNAC et M. POUX parue dans le dernier fascicule des *Industries Agricoles et Alimentaires* (3). Les recherches de la Station Centrale de Narbonne confirment l'observation de la précipitation du tartrate acide de potassium sous l'influence de la concentration et du froid et les répercussions que cette précipitation produit sur la constitution du vin. Les auteurs de cet intéressant mémoire font de grandes réserves sur les conséquences de cette modification de la composition du vin, en particulier au sujet de leur tenue ultérieure. Nous pensons qu'en ce qui concerne les vins concentrés à plus de 20° , un semblable danger n'existe pas.

le vin serait trop dur et trop vert. Une acidité fixe de 3,5 à 5 nous paraît être l'optimum. Il faut éviter de plus les vins trop astringents, car cette astringence subsiste avec encore plus d'intensité dans le concentré.

De même il nous paraît judicieux de choisir des vins dont l'indice de tartre soit peu différent de 1, car ce sont ceux dont la structure physico-chimique sera la moins altérée : par la soustraction du tartrate acide de potassium, cet indice va s'éloigner de 1. En particulier il faut éviter les vins trop riches en potasse, car ils perdraient une trop forte proportion d'acide tartrique.

Les modifications gustatives subies par le vin au cours de cette concentration, dues, soit à ce vieillissement rapide, soit à la précipitation d'une partie importante du tartre et des éléments entraînés par ce précipité, nous font penser qu'un tel traitement *ne doit jamais être pratiqué sur les vins à appellation contrôlée* qui seraient plus ou moins dénaturés. Seuls les vins sans appellation d'origine peuvent être soumis sans inconvénient à un pareil traitement.

2° La perte de la moitié du tartre est un inconvénient sérieux parce que le tartrate acide de potassium est un sel utile à l'alimentation humaine aussi bien par l'acide tartrique qui est un élément rare dans nos aliments, bien que très utile, que par la potasse. Cet inconvénient pourrait être corrigé d'une façon complète en prescrivant la dilution du vin concentré au moment de sa consommation, non pas avec de l'eau pure, mais avec une solution saturée de crème de tartre (5 à 6 g par litre). On rétablirait ainsi d'une façon presque parfaite le vin à sa composition initiale. Mais c'est là une complication pratique dans la majorité des cas.

3° Un autre inconvénient beaucoup plus grave est que la mise dans le commerce libre et à un bas prix de vente de ce vin concentré risque de favoriser l'alcoolisme d'une façon qu'il est impossible de prévoir.

Un des plus singuliers aspects de ce concentré est que la présence des matières extractives concentrées dans la même proportion que l'alcool masque d'une façon curieuse la valeur élevée du degré alcoolique. Un vin de 21° paraît au goût n'avoir que 16 à 18° à beaucoup de dégustateurs non prévenus et cela facilite singulièrement l'absorption de ce vin pur. Ce vin concentré ne doit pas être consommé à l'état pur, mais toujours après dilution.

III. — COMPARAISON ENTRE LE VIN CONCENTRÉ PAR LE FROID ET LES AUTRES PRODUITS VINIQUES DE MÊME ORDRE

1° Comparaison avec les vins vinés

Entre le vin viné et le vin concentré par le froid on ne peut hésiter, le vin viné est un produit plus pauvre que le vin concentré. Ce dernier

contient en effet tous les produits extractifs du vin initial (sauf une partie du tartre), or ces matières extractives constituent les éléments les plus utiles du vin par leur variété, leur rareté dans l'alimentation humaine. Certains prétendent même que la valeur alimentaire du vin est due uniquement à ces matières extractives, mais cette opinion est un peu excessive. L'alcool est brûlé dans l'organisme et à faibles doses il constitue un aliment qui permet l'économie des lipides et des glucides pour une part importante des échanges basaux comme l'ont montré en particulier les travaux de SCHAEFFER et LEBRETON (4) et tout récemment de MACABIES (5). Mais c'est un aliment dégradé inférieur qualitativement. Les physiologistes ont actuellement bien démontré qu'il était incapable d'alimenter directement le travail du muscle comme le fait le sucre.

Il n'en reste pas moins que l'alcool a par ailleurs certaines propriétés physiologiques qui à doses modérées sont utiles. L'alcool est un excitant nerveux comme la caféine du café. Il a une action importante sur la digestion par son action topique sur la muqueuse gastrique et parce qu'il déclenche la réduction du volume du bol alimentaire dans l'estomac en diffusant à travers les parois de cet organe. L'alcool masque la saveur acide du vin et il rend agréable la consommation d'un produit qui est un de nos aliments les plus acides et l'acidité est nécessaire à la digestion pepsique. Telles sont les raisons pour lesquelles l'alcool est utile à doses modérées, mais ce ne sont que des raisons accessoires et on a pu dire qu'au point de vue alimentaire l'alcool est le constituant le moins intéressant du vin (6). Distiller du vin pour garder l'alcool et rejeter les vinasses n'est donc pas une opération judicieuse, c'est même un non sens au point de vue de l'hygiène. A ce point de vue le vinage est une erreur et la concentration est la seule opération rationnelle cf. FLANZY et CAUSERET (7).

2° Comparaison avec les vins concentrés par la chaleur

Généralement la concentration des vins par la chaleur consiste à distiller une partie du vin et à incorporer immédiatement l'alcool produit dans le reste du vin mis en œuvre. Ce procédé est en réalité un vinage un peu spécial et présente seulement quelques avantages sur le vinage proprement dit.

Plus rationnel serait le procédé suivant qui est simple dans son principe théorique, mais plus compliqué que le précédent au point de vue des appareils et du nombre d'opérations.

En opérant sous pression réduite, on peut concentrer le vin à une température toujours inférieure à 40°, ce qui évite l'action de la chaleur sur les matières extractives. L'opération de la concentration pourrait être conduite de la manière suivante : le vin est distillé sous vide en utilisant les appareils déjà en service dans les distilleries qui utilisent cette

méthode remarquable par la qualité des eaux-de-vie qu'elle permet d'obtenir. Au lieu de jeter les vinasses celles-ci peuvent être concentrées, sous vide également, dans un des appareils qui servent à concentrer les moûts sans que la température ne dépasse 50°. L'eau-de-vie est alors ajoutée peu à peu à la vinasse concentrée et l'on peut ainsi obtenir à prix assez bas des vins concentrés dont le titre alcoolique peut aller jusqu'à 60° et dont le volume n'est que le cinquième ou le sixième du volume de vin initial.

Bien que cette concentration se fasse nécessairement à l'abri de l'air, cette méthode me paraît inférieure au point de vue de la qualité gustative des produits obtenus, parce que les parties les plus volatiles, qui sont celles qui concourent le plus au goût du vin, sont en partie perdues. De plus ce procédé est plus brutal que la congélation fractionnée, puisque alcool et extrait sont séparés pour être ensuite mélangés. En outre ce procédé permettrait le dépiquage du vin, opération illicite qu'il n'est souhaitable à aucun point de vue de favoriser.

Voici d'ailleurs l'analyse d'un vin concentré par la chaleur jusqu'à présenter un degré alcoolique de 61°8.

	Vin concentré pur —	Vin concentré dilué par 5 fois son volume d'eau —
Densité	0,9395	0,9929
Alcool	61,8	10,3
Extrait à 100°	105,2	17,54
Cendres	5,04	0,84
Alcalinité en CO_3K_2	2,88	0,48
— en tartre	7,92	1,32
Acidité totale	22,02	3,67
Acidité volatile	2,70	0,45
Acidité fixe	19,32	3,22
Acide tartrique total	0,0	0,0
Potasse totale	10,14	1,69
Rapport alcool/extrait	4,7	4,7

Le vin concentré est rouge foncé, jauni. Un dépôt notable de crème de tartre se trouve au fond de la bouteille. Le vin reconstitué est rouge jauni et a une saveur de vin vieilli. Il a les caractères d'un vin viné, mais si on saturait ce vin de tartrate acide de potassium, ce caractère disparaîtrait à l'analyse.

A plusieurs reprises on a parlé dans la grande presse de « vin en poudre », prétendant que l'on pouvait préparer un tel produit comme on fabrique du café, du lait, du bouillon de viande et même des jus de fruit en poudre.

Il est bien évident que le vin ne peut pas être réduit à l'état d'une poudre, car même si on enlevait toute l'eau on obtiendrait un produit liquide mélangé à une quantité importante d'un produit pâteux et semi solide. L'alcool en effet ne peut être transformé à la température ordinaire en un solide sans un artifice chimique inacceptable dans le cas

présent. Un tel produit très hétérogène ne paraît pas intéressant du point de vue pratique, car par sa dissolution on obtiendrait un produit qui serait trop éloigné du vin initial. L'expérience montre que pour ne pas perdre dans un dépôt trop de matières extractives il ne faut pas dépasser 60° dans le concentré. De toutes façons on doit conserver ce vin concentré, qui est liquide, en récipient imperméable tel que boîte, flacons ou tubes de matières plastiques hermétiques, il ne s'agit donc pas de poudre.

IV. — CONTROLE DE LA QUALITÉ D'UN VIN CONCENTRÉ

Ce contrôle est destiné à vérifier que le vin mis en œuvre était de bonne qualité et que l'opération de concentration a bien été faite par congélation.

La fraude la plus probable paraît en effet être le vinage plus ou moins important pour obtenir le degré alcoolique voulu. Pour déceler cette opération il ne faut pas calculer le rapport alcool/extrait comme on le fait d'habitude, puisque un poids de tartre important a été éliminé. Il faut commencer par corriger le poids d'extrait en ajoutant le poids de ce tartre. Pour un vin de 21° on peut estimer qu'il a été précipité par la concentration de 4 à 6 g de tartre par litre de vin concentré. On ajoutera donc 5 g à l'extrait de ce dernier et introduira ce poids ainsi corrigé dans le rapport alcool/extrait.

Un vin viné présentera de plus des teneurs en cendres et en acidités anormalement basses.

Un vin concentré par la chaleur pourra être distingué d'un vin concentré par le froid par une teneur en acidité volatile anormalement basse.

L'emploi d'un vin piqué ou tourné sera immédiatement décelé par une teneur anormalement élevée de l'acidité volatile. En ce qui concerne la tourne on notera de plus la faiblesse de l'acidité fixe et de l'acide tartrique total et souvent la valeur anormalement élevée de la potasse totale.

La neutralisation partielle de l'acidité par du carbonate de calcium ou de la chaux sera décelée par la pauvreté en acide tartrique, le tartrate de calcium étant encore plus insoluble dans le vin concentré que dans le vin ordinaire.

Il est bien évident que si l'on peut comparer la composition du vin initial à celle du vin concentré, le contrôle de l'opération est aussi simple que sensible. Après la correction due au tartre précité qui est évaluée par le procédé n° 2 exposé plus haut, on calcule le rapport R pour chaque élément dosé et toute supercherie, toute malfaçon du concentrateur sera facilement décelée par la variabilité du rapport R ainsi calculé. Les tableaux II à VII reproduisent les résultats observés au cours de concentrations régulièrement pratiqués.

Au contraire nous indiquons ci-contre les résultats obtenus dans deux concentrations qui n'avaient pas été faites d'une façon régulière.

EXEMPLE I

	Brut	Concentré	Concentré corrigé (1)	R
Densité à 15°	0,9950	0,9900		
Degré alcoolique	10,85	21,2		1,96
Extrait à 100°	23,6	34,1	38,6	1,64
Cendres	1,95	2,69	4,34	2,22
Alcalinité :				
En CO_3K_2	1,68	1,91	3,56	2,12
En tartre	4,58	5,21	9,71	2,12
Sucres	1,65	3,80	3,80	2,30
Sulfates en SO_4K_2	0,36	0,65	0,65	1,80
Chlorures en ClNa	0,095	0,161	0,161	1,70
Acidité totale en SO_4H_2	4,50	5,85	7,02	1,55
Acidité volatile en SO_4H_2	0,50	1,13	1,13	2,26
Acidité fixe en SO_4H_2	4,00	4,72	5,89	1,47
Acide tartrique total en tartre ..	4,05	2,51	10,01	1,85
Potasse totale en tartre	4,94	5,51	10,01	2,02
Anhydride sulfureux en SO_2	0,050	0,082		1,64

(1) Par addition de 4,5 g de tartrate acide de potassium par litre.

EXEMPLE II

	Vin initial	Vin concentré	Vin concentré corrigé (1)	R
Densité à 15°	0,9957	0,9924		
Degré alcoolique	11,5	21,0	21,0	1,82
Extrait	26,14	42,6	46,68	1,79
Cendres	2,15	2,50	3,8	1,77
Alcalinité :				
En CO_3K_2	1,50	1,18	2,68	1,78
En tartre	4,09	3,22	7,50	1,78
Sucres	1,65	2,8	2,8	1,70
Sulfates en SO_4K_2	0,313	0,833	0,833	2,66
Chlorures en ClNa	0,104	0,187	0,187	1,80
Acidité totale en SO_4H_2	4,48	7,47	8,53	1,89
Acidité volatile en SO_4H_2	0,48	1,32	1,32	2,75
Acidité fixe en SO_4H_2	4,00	6,15	7,21	1,80
Acide tartrique total en tartre ..	3,93	3,05	7,13	1,82
Potasse totale en tartre	4,02	3,34	7,42	1,85
Anhydride sulfureux en SO_2	0,073	0,019	0,019	0,26

(1) Par addition de 4,08 g de tartrate acide de potassium par litre.

La variabilité de R montre que le vin concentré n'a pas été obtenu avec le vin brut pur, mais qu'un vin étranger lui a été ajouté.

De plus entre le moment de l'analyse du vin brut et la concentration, le vin s'est légèrement altéré par piqure, aussi le rapport R de l'acidité volatile est-il anormalement élevé.

Il est souhaitable que la composition du vin initial, celle du vin

concentré ainsi que le taux de concentration soient obligatoirement portés sur les étiquettes de mise en vente, ainsi seraient beaucoup facilités les contrôles analytiques et l'on pourrait éviter de nombreuses fraudes.

Qualités minima des vins initiaux et des vins concentrés

Voici à notre avis les caractéristiques des vins que l'on destine à la concentration et du concentré obtenu.

	Vin brut	Vin concentré
Degré alcoolique	supérieur à 10°5	21 à 22°
Acidité totale	inférieure à 6 g	inférieure à 9 g
Acidité volatile	inférieure à 0,7	inférieure à 1,4
Acidité fixe	supérieure à 3,5	supérieure à 5
Anhydride sulfureux total	moins de 0,200	moins de 0,400
pH	entre 2,9 et 3,3	entre 2,9 et 3,3
Extrait à 100°	20 à 28	supérieur à 38
Cendres	inférieures à 3	inférieures à 4
Alcalinité en carbonate	supérieure à 0,6 par g de cendres	
Sucres	inférieurs à 3	inférieurs à 6
Sulfate de potassium	moins de 0,7	moins de 1,4
Chlorure de sodium	inférieur à 0,5	inférieur à 1
Indice de tartre	supérieur à 0,8	supérieur à 0,8 (après correct. de 5 g de tartre)
Acide tartrique — potasse	inférieur à 0,5	inférieur à 1 g
Teneur minimum en acide tartrique	supérieur à 3,25	supérieur à 2,5
Acide citrique	inférieur à 0,5	inférieur à 1 g
Caractères organoleptiques	vin fruité pas d'âpreté ni d'astringence, pas trop d'acidité au goût, mais fraîcheur. Pas de goûts anormaux (s'il s'agit de vin pour la consommation courante).	

V. — EMPLOIS DU VIN CONCENTRÉ A 20-22°

L'emploi principal et normal de ce concentré est la consommation courante par les consommateurs habitant loin des lieux de production ou habitant des pays chauds ou très froids.

C'est sous cette forme stable, inaltérable et de qualité constante que le vin devrait être exporté vers les pays lointains et en particulier vers les colonies et les pays anglo-saxons qui apprendraient ainsi à apprécier les vins français grâce à leur bonne qualité standard. Ces vins seraient en quelque sorte les fantassins de nos vins qui attireraient ensuite cette clientèle vers nos vins de grands crus ⁽¹⁾. De cette façon nous serions sûrs que les vins de consommation courante français présentés sous forme de concentrés à 20-22° seraient et resteraient toujours de bonne qualité

⁽¹⁾ Qui eux ne doivent pas être traités par ce moyen, ni par aucun autre, qui risquerait de les dénaturer ou tout au moins d'en rompre l'harmonie naturelle.

et nous ne risquerions plus de discréditer nos vins par l'offre à cette clientèle lointaine de vins avariés en cours de transport ou pendant un stockage mal surveillé ou de vins additionnés d'antiseptiques frauduleux ou de quantités excessives d'anhydride sulfureux!

La réduction du volume de l'emballage et des frais de transport permettrait l'abaissement des prix de vente (par degré hectolitre) et par conséquent serait un débouché dont l'importance doit être grandissante pour la production viticole.

La présentation de ces concentrés en boîtes de fer blanc vernies convenablement paraît être particulièrement attrayante pour la clientèle lointaine. Elle serait aussi très avantageuse pour les campeurs, les alpinistes, les soldats qui auraient ainsi sous un faible poids, dans un emballage incassable et léger un produit qui pourrait être immédiatement transformé en vin.

La réduction du volume et la certitude d'une conservation sans aléa pourrait permettre de constituer des stocks de sécurité les années de récolte abondante pour être ensuite livrés à la consommation les années de mauvaise récolte. Ce vin concentré pourrait être soit livré en nature, soit ce qui paraît préférable ajouté à la vendange de manière à en rajeunir en quelque sorte la saveur. Cette méthode serait beaucoup plus judicieuse au point de vue de la valeur alimentaire du vin que le vinage à la cuve. Ces concentrés seraient donc de nature à faciliter la régulation du marché des vins.

Un autre emploi bien connu celui-là est la fabrication des vins aromatisés dits « vins apéritifs » et des vins de dessert. Ce débouché est plus restreint, mais il faudrait le favoriser davantage, car ce concentré est plus sain que les vins alcoolisés, nous avons déjà dit pourquoi, et les résultats obtenus sont très bons au point de vue gustatif.

D'autres emplois peuvent être envisagés pour ce produit tels que la fabrication de boissons gazeuses à base de vin, aromatisées ou non, édulcorées ou non, et de *faible degré alcoolique*.

Comme on le voit le vin concentré à 20-22° est un produit qui contient presque tous les éléments constitutifs du vin initial. C'est donc bien un produit naturel et qui a l'avantage sur le vin ordinaire d'une parfaite stabilité, d'une conservation sans aléa et d'un volume plus réduit. S'il était autorisé par la loi, son avenir paraîtrait plein de promesses.

Pour terminer, qu'il nous soit permis de faire un rapprochement. Le lait est un produit plus complexe, plus altérable, plus fragile que le vin. Or la concentration de ce produit n'en altère nullement les qualités alimentaires, puisque c'est sous cet état concentré qu'on l'emploie de préférence et après dilution, pour l'alimentation des nourrissons.

Pourquoi donc refuser une semblable concentration pour le vin qui aurait autant d'avantages? On ne conçoit plus de grandes productions

laitières sans une puissante industrie du lait concentré, de même il faut créer une grande industrie du vin concentré pour ouvrir de nouveaux débouchés à notre production viticole.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BRÉMOND. — Rapport à l'Institut Technique du Vin de juillet 1952.
 - (2) BOUJAREL et ROUBERT. — « Les Problèmes actuels du Vin » édité par l'Association des anciens élèves de l'Institut Agricole d'Algérie 1953.
 - (3) FLANZY, OURNAC et POUX. — *Ind. Agr. et Alim.*, **70**, p. 759, 1953.
 - (4) LE BRETON et SCHAEFFER. — *C. R. Ac. Sc.*, **197**, p. 1066, 1933.
 - (5) MACABIES. — Valeur alimentaire des vins de 8° à 12°, Comité de propagande en faveur du vin, 40, rue Marbeuf, Paris, 8^e.
 - (6) GENEVOIS et RIBÉREAU-GAYON. — Le vin, p. 126, 1947, Hermann, Paris.
 - (7) FLANZY et CAUSERET. — *C. R. Ac. Agr.*, **37**, p. 587, 1951.
-

DOCUMENTATION

SUR LES TANINS, LES POLYPHÉNOLS ET LES PIGMENTS COLORÉS DES CIDRES, LEUR RÔLE ÉVENTUEL DANS LES PHÉNOMÈNES D'OXYDATION ET DE RÉDUCTION EN CIDRERIE

PAR

R. CREFF

Station de Recherches Pomologiques et Cidricoles de Rennes

I. — INTRODUCTION

Dans un précédent mémoire, nous avons mentionné la possibilité d'un système tanins-protéines dans les cidres et nous rappelions les travaux de BOGDANSKY (1) qui, dans le jus de pommes fraîchement pressé, attribue une grande importance à un système orthodiphénol-quinone réversible, l'oxygène moléculaire étant l'accepteur d'hydrogène. Ce système bien que réversible grâce à des oxydases, à une déshydrase et à l'acide ascorbique, est probablement irréversible dans les cidres fermentés par suite de la disparition de l'acide ascorbique et de la déshydrase.

Malheureusement, les connaissances sur les tannoïdes sont si rudimentaires qu'on ne pouvait guère dépasser ces vagues hypothèses. Depuis ce premier mémoire, des travaux intéressants ont apporté quelques faits nouveaux, et l'existence dans les jus de pommes et les cidres de plusieurs tanins, polyphénols et pigments ne doit pas être négligée, lorsque l'on étudie les phénomènes redox.

A. H. WILLIAMS (2) en particulier a commencé l'étude par chromatographie sur papier des « tannoïdes » des cidres et montré l'existence d'acide chlorogénique qui est la seule substance nettement identifiée, dans les variétés aigres, pauvres en tanins (pommes à couteau et pommes aigres en particulier). Dans les pommes amères, il trouve en plus de cet acide, le catéchol et l'épicatéchol et deux groupes de taches correspondant aux leucoanthocyanols apparaissant plus ou moins fortement suivant le solvant.

LAVOLLAY et SEVESTRE (3) montrent l'existence de catéchols dans les pommes et les poires. BRUGIRARD et TAVERNIER (4) avaient caractérisé dans le cidre le quercétol par la réaction de DESHUSSES et BALAVOINE (5), sans trouver d'acide gallique ou de polyphénols susceptibles d'en libérer par hydrolyse et mis au point, en utilisant le sulfate de cinchonine, une méthode de dosage des « tanins vrais », en réalité des tanins condensés, probablement catéchiqes, qu'on appelle aussi parfois phlobatanins.

Des essais préparatoires inspirés des recherches de J. MASQUELIER (6) sur les pigments de la cuticule d'arachide et de A. SOSA (7) sur les spores d'une

prêle, permettent de prévoir l'existence dans le cidre d'un composé flavonique, d'un anthocyanidol (probablement sous forme du leuco-dérivé) et d'un phlobatannin.

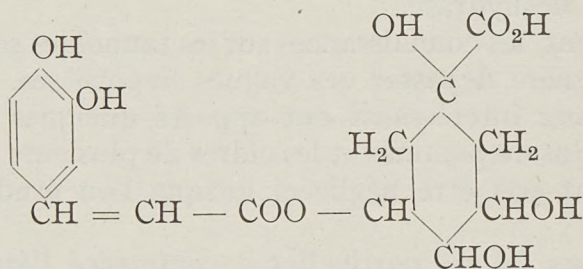
Nous continuons nos recherches tendant à caractériser ces corps, en mettant tout d'abord au point une méthode d'extraction de ces composés. L'épuisement dans un extracteur à liquide ne permet pas d'obtenir des solutions suffisamment concentrées. Si l'on part au contraire d'extraits secs, on n'est pas à l'abri des variations dans les composés tannoïques durant la concentration, ceux-ci étant liés entre eux, comme nous le verrons, par des réactions d'oxydo-réduction.

II. — LES TANNOIDES ET PIGMENTS

On dose en cidrerie sous le terme « matières tannoïdes », par la méthode de LOEWENTHAL, tous les corps possédant une fonction ortho-diphénol ou para-diphénol libre, ainsi que l'a montré A. H. WILLIAMS (2). Tous ces corps donnent avec les sels ferriques une coloration bleue ou verte (cette coloration est liée elle aussi à l'existence de deux groupements phénoliques libres). L'inconvénient de cette méthode c'est qu'elle dose, à côté des tanins, des orthopolyphénols qui n'ont pas de propriétés tannantes, ne précipitent pas le réactif à la gélatine salée, et qu'elle ne dose pas des corps à fonction méta-diphénol qui auraient des propriétés tannantes (acides lecanorique et ses dérivés par exemple). FREUDENBERG a classé les tanins en tanins hydrolysables et tanins condensés :

a) les tanins hydrolysables : hydrolysés par ébullition avec les acides minéraux ou par la tannase.

Parmi eux, celui qui nous intéresse principalement est l'acide chlorogénique, qui est le depside de l'acide caféique et de l'acide quinique, signalé par WILLIAMS (2).

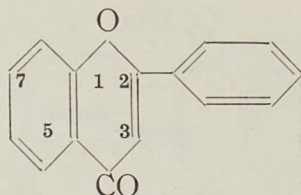


Les Anglais HULME (8) et PHILLIPS (9) ont montré la présence d'acide quinique dans la pomme qui formerait la plus grande part de la fraction des acides organiques de la pomme jusqu'ici non identifiés. On peut penser qu'existent à la fois dans le jus : l'acide chlorogénique et ses deux constituants les acides quinique et caféique. Ce dernier pouvant constituer tout ou partie des polyphénols non tanins (ne précipitant pas la gélatine salée et ne précipitant pas par le sulfate de cinchonine), signalés par BRUGIRARD et TAVERNIER (4).

b) les tanins condensés et leurs précurseurs. Les tanins condensés ou phlobatanins donnent par ébullition avec les acides des phlobaphènes, produits de polymérisation. Nous n'étudierons ici que le groupe le plus important, celui des tanins catéchiques. Ces tanins ont pour substances mères des catéchines ou des corps très voisins (hydroxyflavannes). Ils sont donc liés par leur métabolisme aux flavones, anthocyanidols, catéchines, produits que l'on trouve à l'état libre ou sous forme d'hétérosides dans le règne végétal et dans la pomme en particulier.

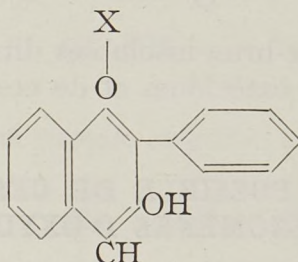
Parmi ces substances, certaines présentent la structure flavonique et sont dérivées de la phényl-benzo-pyrone :

I



S'ils présentent en 3 une fonction alcool on les appelle flavonols, si au contraire ils présentent deux H, ce sont des flavonones. Les flavonols et les flavonones ont été caractérisés dans le règne végétal : ils sont en général polyhydroxylés, jaunes pour les flavonols, incolores ou peu colorés pour les flavonones. De ce groupe dérivent par réduction les anthocyanidols dont le squelette est le suivant :

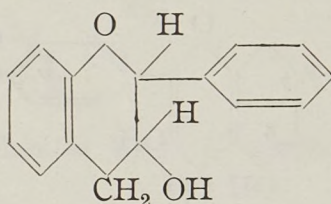
II



et sont colorés suivant le p. H. en rouge, violet ou bleu, l'existence d'un oxonium leur confère un caractère basique.

Une réduction plus poussée mène aux catéchines qui sont incolores :

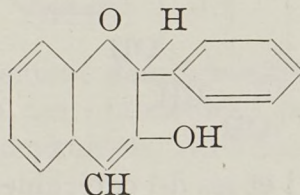
III



Tous ces dérivés se retrouvent dans le règne végétal, les composés naturels étant le plus souvent des hétérosides de ces corps.

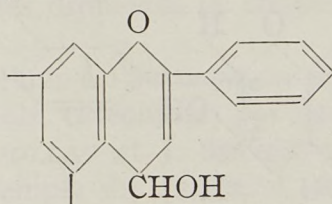
Il existe aussi des composés intermédiaires entre les anthocyanidols et les catéchines : les leuco-anthocyanidols résultant d'une réduction moins poussée, par la poudre de zinc et l'acide acétique par exemple, au lieu de magnésium et de l'acide chlorhydrique :

IV



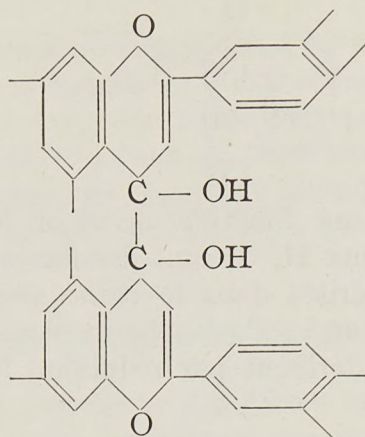
Les phlobatanins (tanins dits catéchiques) dériveraient non pas des catéchines mais d'un corps voisin, la 4 hydroxyflavanne (RUSSEL et TODD 10) par l'intermédiaire de son pinacol :

V



L'existence du groupement CHOH en 4 étant essentielle pour la formation du tannoïde :

VI

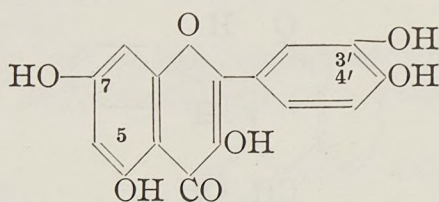


Enfin les composés rouge-brun-insolubles dits phlobaphènes seraient des composés polymérisés de ces catéchines et de ces phlobatanins.

III. — ROLE POSSIBLE DE CES TANNOIDES DANS LES PHÉNOMÈNES D'OXYDO-RÉDUCTION

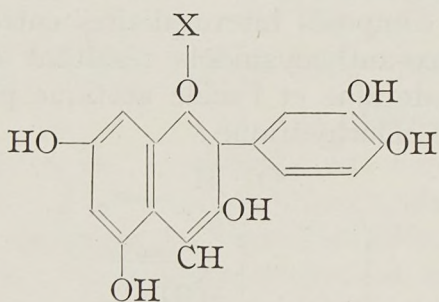
Tous ces composés sont en général polyhydroxylés en 5, 7, 3' et 4' par exemple le quercétol :

VII



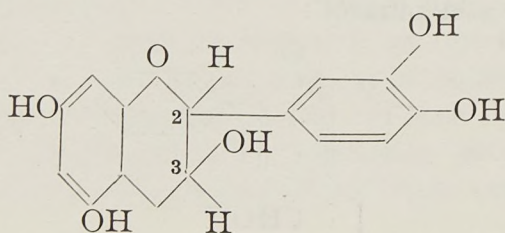
le cyanidol

VIII



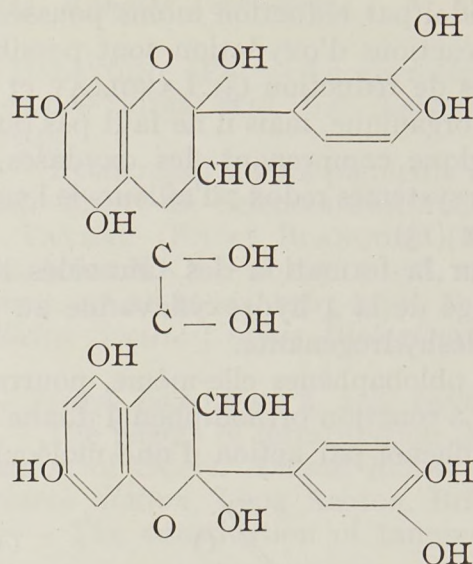
les catéchines (il existe les d, l et les d-l catéchines, les d, les l et les d-l épi-catéchines, les catéchines et les épicatechines se différencient par les positions relatives des H et des OH en 2 et 3) :

IX

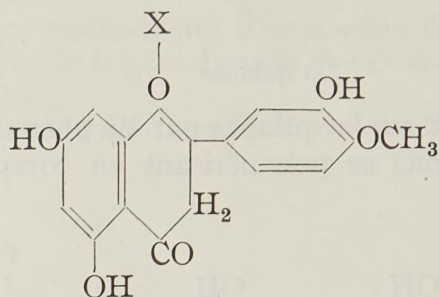


les phlobatanins (selon RUSSEL et TODD).

X

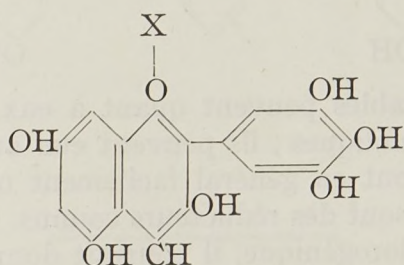


XI



et on connaît aussi des triphénols 3', 4', 5' comme le delphinidol, un anthocyanidol :

XII



Tous ces composés présentent deux groupements phénoliques en ortho, peuvent entrer dans le bilan des « tannoïdes » par la méthode LOEWENTHAL, bien que les flavonols, anthocyanidols, catéchines ne soient pas des tanins précipitant la gélatine salée.

Or, les diphenols sont facilement oxydables, soit par des oxydases, soit par des traces d'ions métalliques, le cuivre surtout : il y a donc là une première possibilité d'oxydation pour tous ces corps (LAVOLLAY et PATRON (11) PATRON (12)). La plupart des diphenols et triphenols s'oxydent très rapidement.

Mais on peut passer de l'une à l'autre de ces substances (flavonols, anthocyanidols, leucoanthocyanidols, catéchines) par des oxydations ou réductions portant sur le cycle (J. LAVOLLAY et J. SEVESTRE 3).

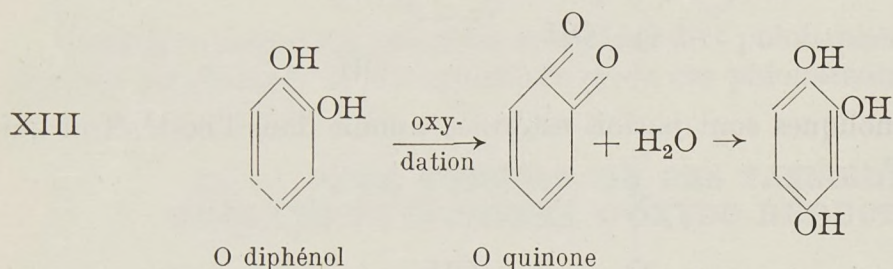
On peut passer par exemple du quercétol au cyanidol par réduction à

l'hydrogène naissant, du cyanidol au catéchol par réduction catalytique, du cyanidol au leucocyanidol par réduction moins poussée.

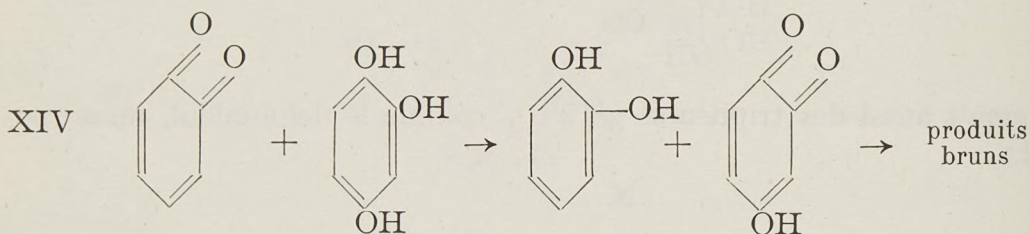
Inversement les réactions d'oxydation sont possibles bien qu'en général plus difficiles que celles de réduction (J. LAVOLLAY et M. VIGNAU 13). Tout ceci est vrai en chimie organique, mais il ne faut pas oublier que nous sommes dans un milieu biologique comprenant des oxydases, et probablement des déshydrases et d'autres systèmes redox ; d'ailleurs le leucocyanidol par exemple est autoxydable à l'air (13).

Si l'on admet pour la formation des tannoïdes l'hypothèse de RUSSEL et TODD (10), le passage de la 4 hydroxyflavanne au pinacol est encore une réaction d'oxydation déshydrogénante.

La formation des phlobaphènes elle-même, pourrait être due à un phénomène d'oxydation. La fonction orthodiphénol donne une ortho-quinone par oxydation, puis un triphénol par action d'une molécule d'eau :



ces triphénols réagissant sur la quinone par un phénomène redox donneraient une hydroxy-orthoquinone se polymérisant en composés bruns les phlobaphènes (PATRON 12) :



Les tanins hydrolysables peuvent quant à eux s'oxyder facilement par leurs groupements diphénoliques ; ils peuvent eux aussi donner des réactions de polymérisation ; ils sont en général facilement oxydables, l'acide chlorogénique, l'acide caféique sont des réducteurs connus. Quant à l'acide quinique, constituant de l'acide chlorogénique, il pourrait donner par oxydation l'acide gallique, ce qui permet d'envisager une autre forme d'oxydation pour l'acide chlorogénique qui pourrait s'oxyder par ses OH phénoliques ou dans le cycle quinique.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BOGDANSKI (C.) — Contribution à l'étude du système oxydo-réducteur des jus de pommes. Thèse Université, Paris, 1950.
- (2) WILLIAMS (A. H.). — The tannin of Apple Juice and Cider : an interpretation of the permanganate titration method. *Annual Report of the agricultural and horticultural Research Station*. Long Ashton, Bristol (1952), p. 219-224.
- (3) LAVOLLAY (J.) et SEVESTRE (J.). — *C. R. Ac. Agri.*, n° 10, p. 259, 1944.

- (4) BRUGIRARD (A.) et TAVERNIER (J.). — Les matières tannoïdes dans les cidres et les poirés. *Annales Technologie I. N. R. A.*, n° 3, p. 311-343, 1952.
 - (5) DESHUSSES (J.) et BALAVOINE (P.). — La quercétine, élément normal des jus de pommes et des cidres. *Mitt. Geb. Lebensmitt. Untersuch. Hyg.*, n° 1, p. 43-46, 1945.
 - (6) MASQUELIER (J.). — Recherches sur les pigments de la graine d'arachide (*Arachis hypogea*). Thèse de Sciences Naturelles, Bordeaux, 1948.
MASQUELIER (J.), TAYEAU (F.) et BLANQUET (P.). — *Bulletin Société Chimie Biologique*, tome XXXI, n° 1, p. 72-78, 1949. — *Bulletin Société Chimique de France*, n° 11-12, p. 1167-1177, Nov.-Déc. 1948.
 - (7) SOSA (A.). — *Bulletin Société Chimie Biologique*, XXXI, n° 1, p. 57, 1949.
 - (8) HULME (A. C.). — *Journ. Exp. Bot.*, 2, 298, 1951.
 - (9) PHILLIPS (J. D.). — The effects of fermentation treatments on the organic acid composition of ciders. *Annual Report of the agricultural and horticultural Research Station*, Long Ashton, Bristol, p. 137-144, 1952.
 - (10) RUSSEL et TODD. — The constitution of tannins. *J. Chem. Soc.*, 421, 1931.
 - (11) LAVOLLAY (J.) et PATRON (J.). — Les jus de fruits, composition et fabrication. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, Vol. 1, n° 3, p. 322, 1947.
 - (12) PATRON (A.). — Les phénomènes d'oxydation dans la production et la conservation des jus de fruits. *Annales de l'Institut des Fruits et Agrumes coloniaux*, n° 7, 1953.
 - (13) LAVOLLAY (J.) et VIGNAU (M.). — *C. R. Ac. des Sciences*, 214, n° 4, p. 86, 1943.
-

BIBLIOGRAPHIE

NOTES SUR LA DISTILLATION DANS LES CHARENTES ⁽¹⁾

PAR

R. LAFON, J. LAFON, P. COUILLAUD

Dans l'introduction les auteurs font l'historique de la distillation et de l'évolution du vignoble charentais, en fonction des demandes dues à l'exportation, évolution facilitée par le voisinage de l'Océan et du cours d'eau navigable de la Charente.

La surproduction en 1630 a fait naître l'idée de la distillation et donna naissance au Cognac, d'où la plantation des cépages « Folle Blanche », Saint-Émilion des Charentes et Uni Blanc. La crise phylloxérique, l'apparition des alcools de grains et la prohibition aux États-Unis, furent les causes susceptibles de réduire la consommation du Cognac, qui ne peut espérer maintenir sa position sur le marché que grâce à sa qualité.

Dans une première partie les auteurs étudient les vins destinés à la distillerie et les substances volatiles de ces vins qui concourent à la formation du bouquet. Les bons vins de chaudière sont suffisamment acides pour fermenter convenablement et se conserver jusqu'à la distillation sans le secours de SO₂.

La région des Charentes a été divisée en crus d'après la qualité des eaux-de-vie et la nature du sol.

Les facteurs essentiels de la qualité sont dus :

Au cépage : la « Folle Blanche » et le « Saint-Émilion » donnent les meilleures eaux-de-vie de Charente. Par la régularité de la qualité des eaux-de-vie obtenues, le Saint-Émilion a remplacé en grande partie « la Folle Blanche ».

Au climat : le climat des Charentes est tempéré et humide. Les eaux-de-vie des années les plus chaudes ont moins de finesse et sont inférieures aux eaux-de-vie des années pluvieuses et froides.

Au sol : les sols et sous-sols calcaires des Charentes assurent une alimentation régulière et une maturité progressive ; les levures différentes selon la nature des sols aident à l'élaboration des fines eaux-de-vie.

Le 4^e facteur : *la vinification*, sera traité dans une publication ultérieure.

Les auteurs examinent dans une deuxième partie les différentes parties de l'alambic charentais et les conditions qui doivent présider à son exécution et à son montage, ainsi que la marche de cet alambic : distillation continue à repasses successives. Cette distillation est longue et coûteuse mais donne des produits d'une qualité supérieure à celle des eaux-de-vie obtenues par d'autres méthodes.

Un chapitre est consacré au passage des substances volatiles au cours de la distillation. Des échantillons ont été prélevés durant les « brouillis » et les « bonnes chauffes » afin de les analyser pour tracer les courbes qui traduisent le passage des composants du distillat en fonction du degré de celui-ci.

Les graphiques montrent que : au cours de chauffes successives, les acidités volatiles diminuent considérablement, les éthers sont sensiblement

(1) Ed. Station viticole du Bureau National Interprofessionnel.

réduits, les alcools supérieurs et aldéhydes varient peu, le furfurol qui n'existe pas dans le vin prend naissance au cours du chauffage dans l'alambic.

Le rôle du Cu au cours de la distillation est important. Les eaux-de-vie à la sortie de l'alambic contiennent toujours quelques mg de Cu par litre. Le cuivre fixe les *acides gras secrétés* par les levures durant la fermentation et entraînés par la vapeur ; il se forme des sels insolubles qui sont éliminés. Ces acides gras ont une odeur désagréable et le Cu de l'alambic, en les fixant, permet d'obtenir des eaux-de-vie fines. Il est nécessaire de nettoyer souvent le chapiteau et le serpent, pour que le Cu joue son rôle, ils doivent être propres et nus.

Les auteurs consacrent plusieurs chapitres à la pratique de la distillation : nettoyage de la chaudière, choix du vin et distillation proprement dite, illustrés de graphiques montrant l'évolution du degré du distillat au cours de la « bonne chauffe » et l'évolution des acides volatiles.

Ils font remarquer que, en année de pourriture on ne distille avec leur lie que les vins provenant de vendanges entièrement saines.

Pour les vendanges à l'état de « bon pourri » (pourriture noble, début de pourriture grise), la comparaison des eaux-de-vie obtenues permettra de déterminer la méthode à utiliser : méthode de distillation au goût consiste à goûter les « brouillis », les « bonnes chauffes », pour déterminer les meilleurs moments pour effectuer « les coupes ».

Lorsque les eaux-de-vie obtenues manquent un peu de « netteté » il est recommandé de les redistiller. L'analyse montre que seule la quantité d'acides volatiles a diminué, les éthers, aldéhydes et alcools supérieurs sont restés les mêmes.

Dans une 3^e partie, les auteurs étudient l'analyse organoleptique (dégustation) et l'analyse chimique des cognacs et des vins destinés à la distillation.

Les principales qualités organoleptiques des eaux-de-vie sont la finesse et le corps. L'analyse chimique des cognacs comporte le dosage habituel du « non alcool » des eaux-de-vie. Cette analyse ne peut renseigner très utilement sur la qualité car certains corps présents en très faible quantité presque impossible à doser ont plus d'influence sur le bouquet et le goût que d'autres corps présents en quantité importante. Le total « non alcool » peut varier selon l'origine des vins et le mode de distillation. Les méthodes actuelles de dosage de ce « non alcool » ne peuvent donner une précision de plus de 5 p. 100.

Ces notions ont été complétées par un résumé des diverses connaissances utiles sur l'alcoométrie.

Les auteurs décrivent ensuite les conditions pour un bon logement et vieillissement du cognac (bois sec, chêne du Limousin) et notent les décrets qui fixent la législation du cognac (aire de production — encépagement — vinification, procédés de distillation).

Ces notes intéressent particulièrement les producteurs de cognac pour qui elles constituent un guide à la fois pratique et scientifique de la distillation. Elles leur donnent en effet les bases théoriques nécessaires aux manipulations ; certains conseils pratiques déduits de données théoriques se trouvent en accord avec les méthodes utilisées par les très bons distillateurs.

Juillet 1954.

M^{me} L. BOUZIGUES.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVERIE.

**MIGRATION DE LA VITAMINE C ET DU FACTEUR P,
DES ÉLÉMENTS SOLIDES DU RAISIN
DANS LES JUS ÉLABORÉS PAR LE PROCÉDÉ :
SULFITATION — MACÉRATION — DÉSULFITATION**

PAR

M^{lle} Andrée OURNAC

Station Centrale de Recherches sur l'Œnologie,
la Cidrerie et les Jus de Fruits, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

- I. — Introduction. — Protocole expérimental.**
 - II. — Migration de la vitamine C.**
 - 1. Dosage dans les constituants solides frais.
 - 2. Dosage dans les constituants solides après macération.
 - 3. Dosage dans les jus de macération.
 - 4. Interprétation des résultats.
 - 5. Conclusion.
 - III. — Migration du facteur P.**
 - 1. But poursuivi.
 - 2. Méthode utilisée.
 - 3. Résultats obtenus.
 - 4. Interprétation des résultats.
 - 5. Conclusion.
 - IV. — Conclusion générale.**
 - V. — Bibliographie.**
-

I. — INTRODUCTION

Au cours de travaux antérieurs (1) nous avons mis en comparaison quelques procédés de préparation de jus de raisin :

1^o Au point de vue pratique et économique. Nous recherchions la technique de stockage et de mise en bouteille, la plus simple et la plus économique, permettant d'empêcher tout départ de fermentation et toute attaque par les moisissures.

2^o Au point de vue gustatif.

3° Au point de vue conservation des macro-éléments les plus fragiles et les plus intéressants : sucre et acides organiques.

4° Au point de vue valeur vitaminique : teneur en vitamine C et en facteur P.

A ces divers titres les jus sulfités-désulfités nous ont donné les meilleurs résultats.

Un cas a particulièrement retenu notre attention : nous avons laissé macérer en présence de SO_2 une certaine quantité de raisins (rafle comprise) et nous avons prélevé des échantillons de jus après différents temps de macération.

Nous avons alors constaté qu'au cours de cette macération avec les éléments solides du fruit (rafles et pellicules) le jus s'enrichit en acide ascorbique et en substances polyphénoliques dans des proportions considérables.

Les travaux d'un certain nombre d'auteurs (2) et les dosages de Vitamine C que nous avons par la suite effectués dans le raisin (3) aboutissent aux conclusions suivantes :

La vitamine C et le facteur P sont localisés en grande partie dans la pellicule et la rafle du raisin.

A la suite de tous ces résultats nous avons entrepris une étude plus approfondie de la macération en milieu sulfureux.

Nous nous sommes attachés à préciser les influences respectives de la rafle des pellicules et du temps sur la migration qualitative et quantitative dans le jus de la vitamine C et du facteur P contenus dans les constituants solides du fruit.

Protocole expérimental

Nous avons choisi comme matière première des cépages (aramon et carignan) cultivés en abondance dans notre région et convenant particulièrement bien à la fabrication de jus grâce à leur qualité et au rendement cultural.

TABLEAU I

Caractéristique des cépages utilisés

Cépage	Poids de 100 grains en g	Sucre g/l	Acidité totale g SO_4H_2 /l	Vitamine C mmg/l
Aramon 14 septembre.....	487	170	5	45
Carignan 21 septembre.....	252	211	5,1	72

Nous avons utilisé de grosses quantités de fruit, de manière à ce que les prélèvements successifs de jus ne modifient pratiquement pas le rapport existant naturellement entre liquide et solide.

La cueillette a été réalisée au moment de la pleine maturité du grain.

Nous avons aussitôt dosé la vitamine C dans les différents constituants : rafle, pellicule, pulpe, jus.

Nous avons ensuite mis en train deux sortes de macération pour chaque cépage ; l'une avec la rafle, l'autre sans la rafle, les raisins étant égrappés à la main ; tous les huit jours, un échantillon de jus était prélevé. Après 60 jours, nous avons séparé le jus de goutte, pressuré le marc et obtenu le jus de presse.

A ce moment, nous avons déterminé les doses de vitamine C se trouvant encore dans les rafles et dans les pellicules, après égouttage et après pressurage. Les différents échantillons de jus sulfité obtenus, ont été encore conservés un mois avant d'être désulfités et embouteillés suivant la technique habituelle.

Les dosages d'acide ascorbique et du facteur P ont été effectués quelques jours après.

II. — LES RECHERCHES SUR LA MIGRATION DE LA VITAMINE C

La vitamine C des parties solides a été extraite comme précédemment (3) par l'acide métaphosphorique à 5 p. 100 et dosée au moyen de dinitrophényl-hydrazine, technique ROE et OESTERLING.

Expression des résultats

Les résultats inscrits dans le Tableau II, expriment en milligrammes la somme acide ascorbique (AA) + acide déhydroascorbique (ADA).

TABLEAU II

Répartition AA + ADA

	Pour 100 g de matière fraîche				Pour 100 grains				1 000 g de raisin (grain + rafle)			
	jus	pulpe	pellicule	rafle	jus	pulpe	pellicule	rafle	jus	pulpe	pellicule	rafle
Aramon 14 sept. ...	4,2	4,7	25,5	36,9	16	21	15	2,6	32	42	30	5,2
Carignan 21 sept...	7,2	5,6	57,1	32,5	13	14,2	15	1,2	52	55,4	60	4,7

Le carignan est plus riche en Vitamine C que l'aramon.

1 kg de carignan (rafle + grain) apporte : 173 mmg ;

1 kg d'aramon (rafle + grain) apporte : 106 mmg.

Chaque élément constitutif du carignan (jus, pulpe et pellicule) a une teneur en vitamine C supérieure à celle de chaque élément constitutif de l'aramon, la rafle exceptée.

TABLEAU III

*mmg de vitamine C retenue dans 100 g de rafles
et de pellicules égouttées et pressurées*

	Aramon		Carignan	
	sans rafle	avec rafle	sans rafle	avec rafle
Pellicules égouttées	10	10	13	14
Pellicules pressurées.....	11	11	14	12
Rafles égouttées		8,50		10
Rafles pressurées		8,50		10

Après 50 jours de macération sulfureuse pour l'aramon et 60 pour le carignan, les rafles et les pellicules du raisin renferment encore un peu de vitamine C, elles ne sont pas complètement épuisées. Le pressurage influe peu sur la teneur des pellicules et pas du tout sur la teneur des rafles.

TABLEAU IV

*Influence de la durée de la macération sulfureuse
sur la richesse en vitamine C*

Temps de macération en jours	Aramon		Carignan	
	sans rafle	avec rafle	sans rafle	avec rafle
Jus frais.....	45	45	72	72
4	65	60	90	102
8 :.....	68	64	110	108
15	68	70	120	113
22	70	78	122	117
29	75	80	127	120
36	80	80	132	125
43	88	85	132	130
50 { goutte	90	88	135	130
50 { presse.....	95	90		
57 { goutte			135	133
57 { presse.....			140	135

Au fur et à mesure de la macération la teneur du jus en Vitamine C augmente et après un certain temps est pratiquement doublée.

Interprétation des résultats

1° Les éléments solides du fruit (rafles et pellicules) se sont appauvris en vitamine C tandis que le jus s'est enrichi en cette même vitamine.

2° Les jus de presse sont légèrement supérieurs aux jus de goutte en valeur vitaminique.

3° Les jus ayant macéré avec la rafle ne s'enrichissent pratiquement pas plus en vitamine C que ceux ayant macéré sans la rafle. La vitamine C que peut apporter la rafle dans le jus est au maximum : 7 mmg/l dans le cas de l'aramon et 6 mmg/l dans le cas du carignan, ce qui produirait sur la dose des jus macérés une augmentation de 7 p. 100 pour l'aramon et de 4 p. 100 pour le carignan.

Dans notre cas ce pourcentage serait encore plus faible puisque la rafle conserve à la fin de l'opération une certaine dose de vitamine. Ce faible apport de la rafle doit être masqué par l'eau de végétation qu'elle fournit aussi.

Proportion dans laquelle la Vitamine C disparue des éléments solides se retrouve dans le jus

a) Supposons pour cela que toute la vitamine contenue dans les rafles, les pellicules et la pulpe, passe intégralement dans le jus et calculons la dose finale que présenterait le jus.

En tenant compte du rendement du fruit en jus, des teneurs respectives de chaque élément en vitamine et du rapport des poids de ces éléments à celui du fruit, nous pouvons déterminer la répercussion sur un litre de jus de l'apport vitaminique de chaque élément :

Aramon : il a fallu 139 kg de raisin pour faire 1 hl de jus :

Rafle enrichirait 1 l de jus de 7,2 mmg de vitamine C ;

Pellicule enrichirait 1 l de jus de 42 mmg de vitamine C ;

Pulpe enrichirait 1 l de jus de 14 mmg de vitamine C ;

(nous appelons ici pulpe la substance qui reste lorsque l'on a enlevé au grain la pellicule et le jus).

Le jus qui au départ possédait 45 mmg de vitamine par litre contenait alors :

Jus macéré sans rafle $45 + 42 + 14 = 101$ mmg/l ;

Jus macéré avec rafle $45 + 42 + 14 + 7,2 = 108$ mmg/l.

Nous obtenons dans nos essais, après 50 jours de macération 95 mmg/l dans le jus sans rafle, et 90 mmg/l dans le jus avec rafle.

Carignan : il a fallu 144 kg de raisin pour 1 hl de jus :

Rafle enrichirait 1 l de jus de 6,4 mmg/l de vitamine C ;

Pellicule enrichirait 1 l de jus de 8,6 mmg/l de vitamine C ;

Pulpe enrichirait 1 l de jus de 4 mmg/l de vitamine C ;
il en résulterait, le jus de départ titrant 72 mmg/l :

Jus macéré sans rafle $72 + 86 + 4 = 162$ mmg/l ;

Jus macéré avec rafle $72 + 86 + 4 + 6 = 168$ mmg/l.

Nous avons trouvé au cours de nos essais 140 mmg/l dans le 1^{er} cas et 135 dans le 2^e cas.

La dissolution de la vitamine C a été de 95 p. 100 dans le cas de l'aramon (sans rafle) et de 88 p. 100 dans le cas du carignan (sans rafle).

b) Étant donné la quantité de vitamine C retrouvée en fin de macération dans les rafles et les pellicules pressurées, déterminons la perte en vitamine subie par un litre de jus macéré :

Aaramon :

Perte due à la rétention de vitamine par la rafle 2 mmg/l ;

Perte due à la rétention de vitamine par les pellicules 14 mmg/l (avec ou sans rafle).

Carignan :

Perte due à la rafle 1,8 mmg/l ;

Perte due aux pellicules (sans rafle) 14 mmg/l ;

Perte due aux pellicules (avec rafle) 20 mmg/l.

c) Ajoutons ces quantités de vitamine disparues avec le marc aux doses trouvées dans les jus en fin de macération ; nous obtenons :

Aramon :

Sans rafle $95 + 14 = 109$ mmg/l pour 101 (valeur calculée) ;

Avec rafle $90 + 14 + 2 = 106$ mmg/l pour 108 (valeur calculée) ;

Carignan :

Sans rafle $140 + 14 = 154$ mmg/l pour 162 (valeur calculée) ;

Avec rafle $135 + 20 + 1,8 = 157$ mmg/l pour 168 (valeur calculée).

Donc :

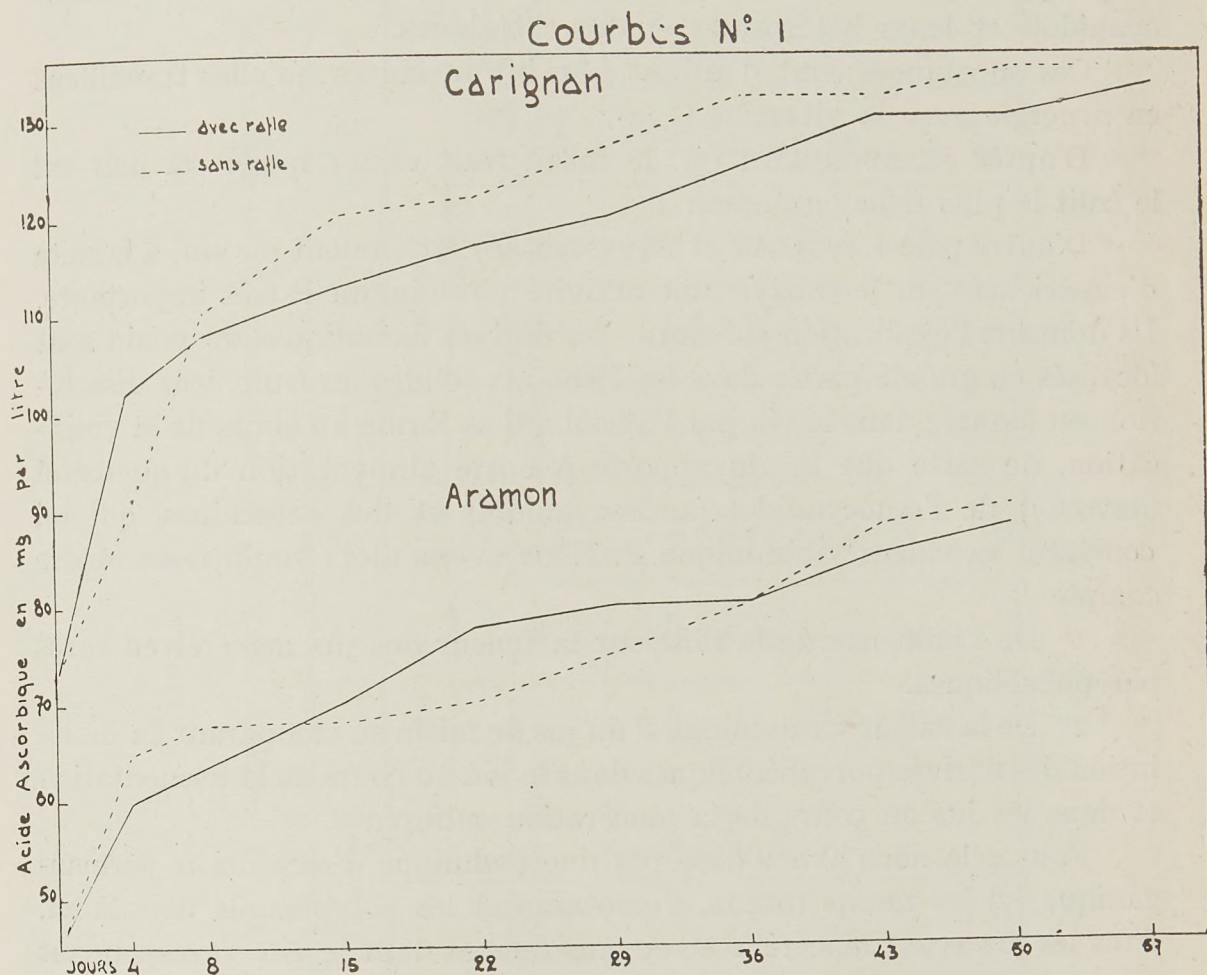
Vitamine du jus macéré + vitamine restée dans le marc = vitamine du fruit frais entier (à 5 p. 100 près dans le cas du carignan).

Pratiquement il ne s'est pas produit de perte de vitamine C. La dose de vitamine restant dans la pellicule est impossible à extraire ou presque, elle résulte sans doute, de l'équilibre qui s'établit au cours de la macération entre la composition des liquides baignant les parties solides d'une part et se trouvant à l'intérieur de ces mêmes parties solides d'autre part.

En 50 jours de macération, toute la vitamine C contenue dans les éléments solides du raisin est passée dans le jus.

Vitesse avec laquelle s'effectue la dissolution de la vitamine dans le jus

Nous avons pour chaque cas dessiné une courbe en portant en abscisse les temps de macération et en ordonnée les doses de Vitamine C (courbe N° 1). La dissolution de la vitamine dans le jus s'effectue très rapidement au début de la macération, puis se ralentit considérablement.



Dans les 5 (carignan) et 8 (aramon) premiers jours, nous obtenons la moitié de l'enrichissement obtenu en 60 et 50 jours, les autres 50 p. 100 s'échelonnent sur 45 jours.

Conclusion

La macération en milieu sulfité du jus au contact des éléments solides du raisin permet la transposition dans le jus de 90 p. 100 de la vitamine contenue dans ces éléments.

La rafle malgré sa teneur élevée en vitamine C (35 p. 100) n'influe pas sur la dose finale du jus macéré en sa présence.

Le jus de macération sera d'autant plus riche en acide ascorbique que la teneur de la pellicule du grain en cet acide sera plus élevée et que la durée de la macération sera plus longue, 60 jours étant un maximum.

III. — RECHERCHES SUR LA MIGRATION DU FACTEUR P

On groupe sous le nom de facteur P un ensemble de corps possédant la propriété de diminuer la fragilité des capillaires et de restreindre leur perméabilité aux protéines.

L'activité vitaminique P a été attribuée à un certain nombre de corps apparentés à la flavone, des flavonols et leurs hétérosides, des anthocyanidols et leurs hétérosides et des catéchines.

Ces substances sont d'autant plus intéressantes qu'elles travaillent en synergie avec la vitamine C (4).

D'après SCARBOROUGH (5), le raisin fruit entier rouge ou noir est le fruit le plus riche en facteur P.

D'autre part LAVOLLAY et SEVESTRE (6), attribuent au vin, à la suite d'expériences sur le cobaye, une activité vitaminique P très importante. Ils donnent l'explication suivante : les dérivés flavoniques du raisin sont localisés en grande partie dans les éléments solides du fruit, leur dissolution est assurée dans le vin par l'alcool qui se forme au cours de la vinification, de sorte que le vin apporte à notre alimentation du quercetol (flavonol) de l'œnocyanidol (anthocyanidol) et des catéchines qui lui confèrent sa valeur vitaminique P. Nous avons alors voulu nous rendre compte :

1^o De l'influence de la rafle sur la teneur des jus macérés en corps polyphénoliques.

2^o De la valeur vitaminique P du jus de raisin en comparant la dissolution des dérivés polyphénoliques dans le vin au cours de la fermentation et dans les jus au cours de la macération sulfureuse.

Pour cela nous avons dosé par une technique d'oxydation permanganique (7) les tanins totaux, l'œnotanin et les polyphénols non tanin, dans les jus ayant macéré avec et sans rafle et dans le vin correspondant ayant fermenté avec rafle et pellicule.

Les trois échantillons de vin ont été obtenus par fermentation du jus de carignan à 37° en présence des rafles et des pellicules.

Le 1^{er} a été séparé du marc au bout de 6 jours, le 2^e au bout de 8 jours et le 3^e au bout de 10 jours.

Au moment du pressurage, le 1^{er} n'avait pas tout à fait fini de fermenter ; le 2^e avait complètement fermenté de sorte que le 3^e a complètement fermenté en présence des éléments solides et est resté environ 2 ou 3 jours au contact de ces éléments.

Résultats obtenus

Les résultats sont exprimés en milliéquivalents oxydants par litre et sont inscrits dans les tableaux V et VI et les courbes 2, 3, 4. En abscisse

TABLEAU V

Matières polyphénoliques des jus macérés exprimées en milliequivalents oxydants par litre

[illegible]

on a porté les temps de macération et en ordonnées les milliéquivalents oxydants par litre.

TABLEAU VI

Matières polyphénoliques du vin de carignan

Temps de macération (jours)	Oxydabilité	Tanins totaux	Oenotанин	Poliphénols non tanin
6	69,3	47,6	29	18,6
8	70	48,5	30	18,5
10	71,4	49,7	32,1	17,6

Interprétation des résultats.**1^o Valeur de l'enrichissement :**

Tous les jus se sont considérablement enrichis en matières polyphénoliques.

Les jus provenant de macération avec rafle contiennent davantage d'oénotanin et de polyphénols non tanin que ceux ayant macéré sans rafle.

L'influence de la rafle est ici très marquée.

Voici les coefficients d'enrichissement :

Aramon :

Sans rafle : Les tanins totaux sont multipliés par 20.

Les polyphénols non tanin sont multipliés par 7,5.

Avec rafle : Les tanins totaux sont multipliés par 27.

Les polyphénols non tanin sont multipliés par 10.

Carignan :

Sans rafle : Les tanins totaux sont multipliés par 20.

Les polyphénols non tanin sont multipliés par 10.

Avec rafle : Les tanins totaux sont multipliés par 31.

Les polyphénols non tanin sont multipliés par 16.

Nous avons calculé l'accroissement pour cent consécutif à la présence de la rafle au bout de 50 jours pour l'aramon et 60 jours pour le carignan.

Aramon :

Oénotanin : 26 p. 100 en plus avec rafle.

Polyphénols non tanin 33 p. 100 en plus avec rafle.

Carignan :

Oénotanin 48 p. 100 en plus avec rafle.

Polyphénols non tanin 55 p. 100 en plus avec rafle.

La présence de la rafle a une répercussion plus marquée sur la teneur en polyphénols non tanin que sur la teneur en œnotanin.

2° Vitesse de la dissolution par macération sulfureuse

La dissolution des substances polyphénoliques est très rapide au début de la macération, au cours des 8 premiers jours et ne semble pas être complètement terminée au bout de 60 jours.

Si on compare la teneur des jus après 8 jours et après 60 jours de macération on constate que, au bout de 8 jours il est passé dans le jus :

1° Pratiquement la totalité des polyphénols non tanin. Après ce laps de temps leur dose reste constante ou peut même diminuer légèrement ;

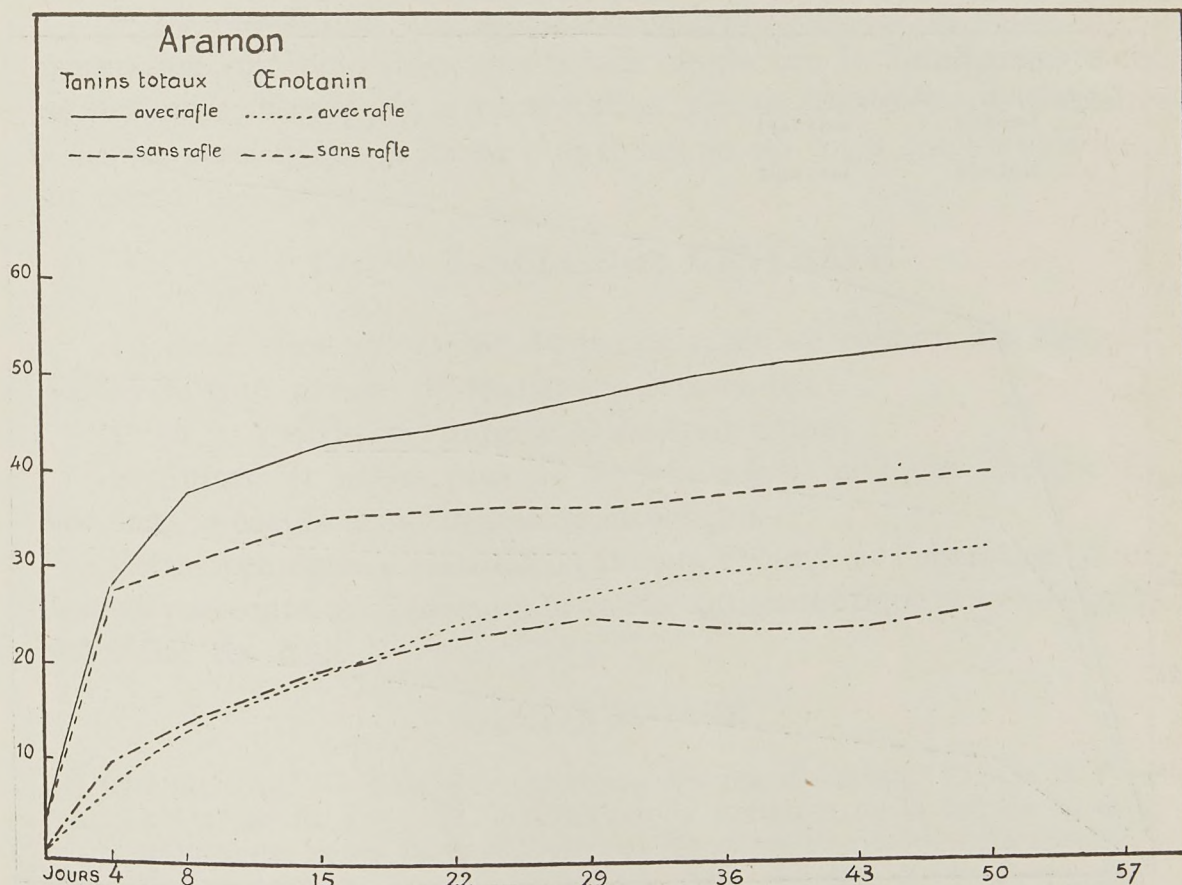
2° La moitié de l'œnotanin ;

3° Les trois quarts des tanins totaux.

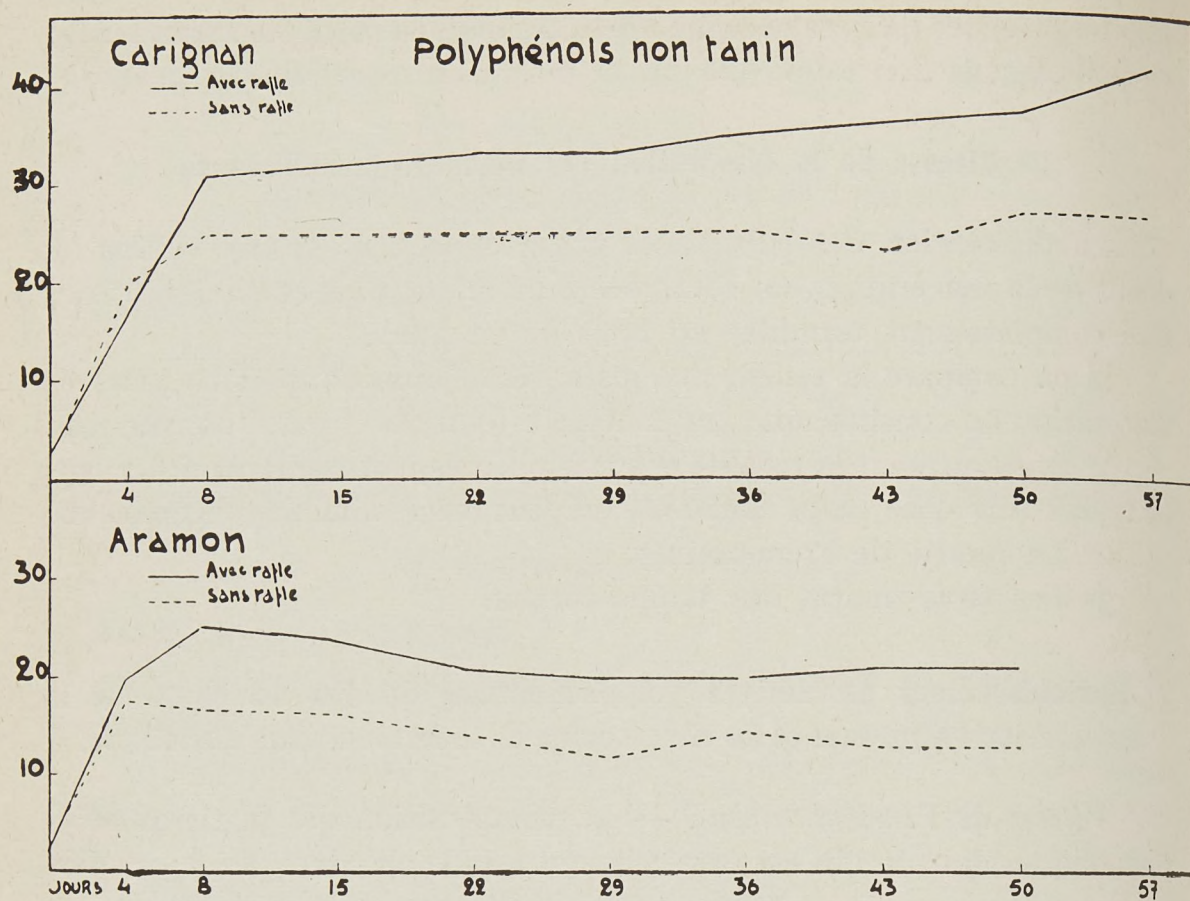
3° Enrichissement en dérivés polyphénoliques du jus au cours de la macération sulfureuse et du vin au cours de la fermentation alcoolique.

Vitesse de l'enrichissement. — La transposition des matières polyphénoliques dans le vin est extrêmement rapide au cours des 4 premiers

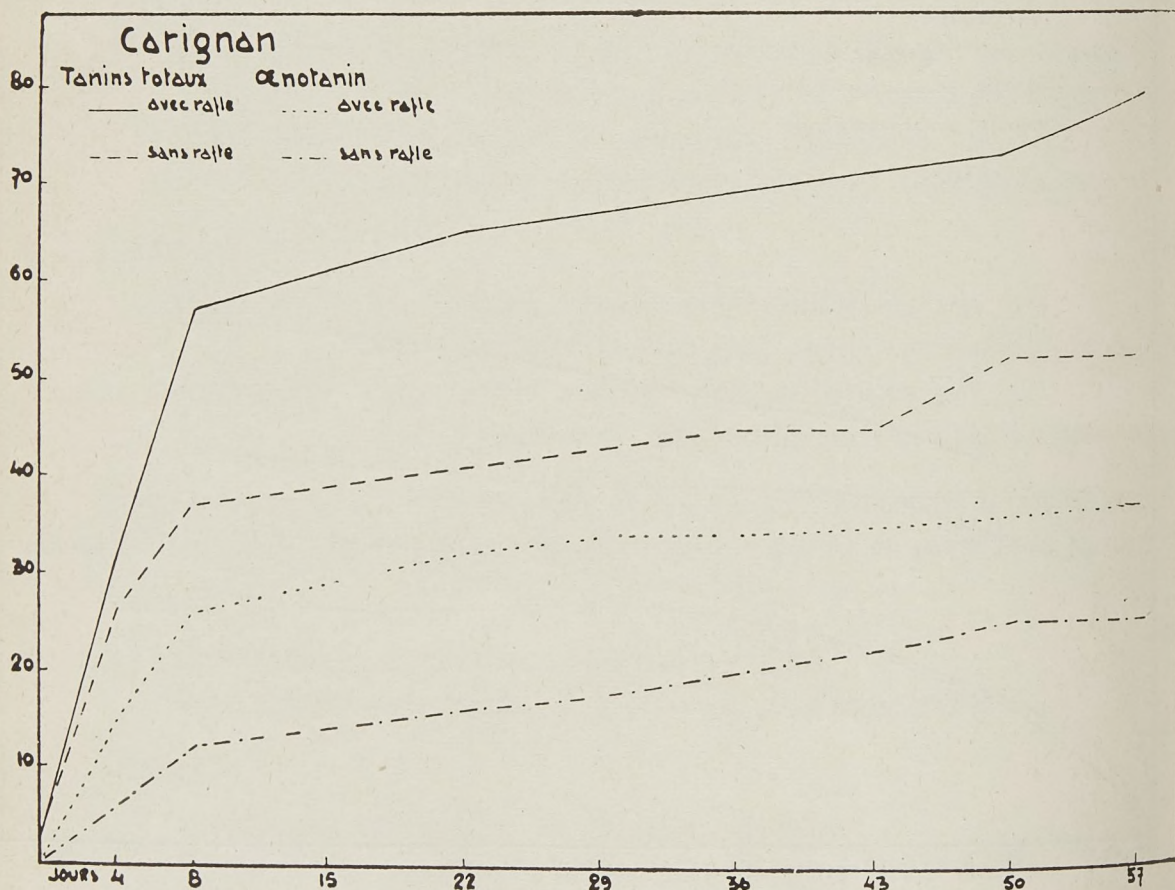
COURBES N° II



Courbe 3



Courbe 4



jours c'est-à-dire au cours de la fermentation alcoolique proprement dite ; elle est bien plus rapide que dans le jus ; dans le cas de l'œnotanin elle est deux fois plus rapide.

Dès que la production d'alcool est terminée, la dissolution est considérablement ralentie, celle des polyphénols non tanin est même complètement arrêtée.

Dans le cas du jus, il faudra environ 20 jours de macération si l'on considère l'œnotanin et 6 à 8 jours si l'on considère les polyphénols non tanin, pour atteindre des doses de ces corps égales à celles que l'on trouve dans un vin courant.

Valeur de l'enrichissement. — De toutes façons, si la fermentation du jus de raisin permet d'obtenir une boisson riche en facteur P, la macération en milieu sulfité semble le permettre aussi, la présence de la rafle aura comme conséquence d'atteindre le but d'une manière plus rapide et plus complète.

Conclusion

1° La macération du jus en milieu sulfité avec rafles et pellicules permet d'obtenir un jus bien plus riche en substances polyphénoliques que la macération avec pellicules seulement.

2° L'augmentation de l'enrichissement porte davantage sur les polyphénols non tanin que sur l'œnotanin.

3° La dissolution des substances polyphénoliques au cours de la macération sulfureuse bien que moins rapide que la dissolution de ces mêmes corps au cours de la fermentation, permet tout de même d'aboutir à des jus aussi riches et même plus riches en ces corps que les vins issus du même moût.

IV. — CONCLUSION GÉNÉRALE

La macération sulfureuse du jus de raisin au contact des éléments solides du fruit permet de transposer dans ce jus :

1° 90 p. 100 de la vitamine C du fruit entier.

2° Autant et même plus de dérivés polyphénoliques (facteur P), que dans le cas de la fermentation alcoolique.

Cette technique d'élaboration de jus aboutit à l'obtention d'une boisson possédant au maximum la valeur antiscorbutique et anti-fragilité vasculaire du fruit.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OURNAC (A.). — Étude d'utilisation du jus de raisin. *Vignes et Vins*, nos 27-28-29, 1953. Recherches sur la variation de la teneur en acide ascorbique et en facteur P du jus de raisin en fonction de son mode de préparation. *Ann. de l'I.N.R.A., Série A, Ann. Tech.*, 2, 99, 1953.

- (2) GUERASSIMOFF (M.) et WINOGRADOWA (N.). — La vitamine C dans le jus de raisin et dans le vin ; *travaux de la station expérimentale uvale et vinicole de Crimée*, fascicule 3, Yalta, 1931.
- VENEZIA (M.). — Sull' acido ascorbico (vitamina C) nell'uva e nel vine. *R. Stazione sperimentale di viticoltura e di enologia. Conegliano-Annuario*, VIII^e, 67, 1937-1938.
- RANDOUIN (M^{me} L.). — Recherches sur la valeur alimentaire des jus de raisin frais et des vins, au point de vue de leur teneur en vitamines. *Bull. int. du vin*, 7, 62, 1934.
- FLANZY (M.) et MICHAUX (A.). — Travaux non publiés : recherches sur la composition du raisin : 1^o présence et répartition de la vitamine antiscorbutique ; 2^o nouvelles recherches sur la présence et la répartition de la vitamine antiscorbutique dans les raisins. Influence de l'anhydride sulfureux sur la vitamine présente dans les rafles, 1940.
- LAVOLLAY (J.) et PATRON (A.). — Les jus de fruits. Composition et fabrication. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation*, 1, 315, 1947.
- (3) OURNAC (A.). — Teneur en acide ascorbique des différentes parties du raisin (rafle, pellicule, pulpe, jus). *Ann. de l'I. N. R. A, Série A, Ann. Techn.*, 3, 231-239, 1954.
- (4) GIROUD (A.) et RATSIMAMANGA (A. R.). — Acide ascorbique et Vitamine C. *Activités scientifiques et industrielles*, Herman et C^{ie}, éditeurs, 1942.
- (5) SCARBOROUGH (H.). — Observations on the nature of vitamin P and the vitamin P potency of certain foodstuffs. *Biochem. I.*, 39, 271-278, 1945.
- (6) LAVOLLAY (J.) et SEVESTRE (J.). — Le vin considéré comme un aliment riche en vitamine P. *C. R. Ac. Agri.*, 3, 259, 1944.
- (7) NÈGRE (E.). — Thèse de docteur ès-Sciences Physiques, 1945. Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin, Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg.
-

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES ACTIVEURS ET DES INHIBITEURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DES MOÛTS DE RAISIN

PAR

M^{lle} S. LAFOURCADE

Ingénieur Docteur

PLAN DU MÉMOIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

MILIEUX, MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

- I. — Milieux de fermentation.
- II. — Levures utilisées.
- III. — Température d'incubation.
- IV. — Conditions d'aération.
- V. — Détermination de l'évolution de la fermentation.
 - a) Dosage des sucres réducteurs.
 - b) Pesées du gaz carbonique dégagé.
- VI. — Mesure de la croissance des levures.
 - a) Numération des cellules totales à l'hématimètre.
 - b) Numération des cellules vivantes sur milieu nutritif solide.

PREMIÈRE PARTIE

ACTIVEURS DE LA CROISSANCE DES LEVURES ET DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'AÉRATION

- I. — Influence de l'aération en cours de fermentation.
- II. — Variations du potentiel d'oxydo-réduction en cours de fermentation.

III. — Influence du degré alcoolique.

IV. — Conclusions.

CHAPITRE III

NUTRITION AZOTÉE DES LEVURES

I. — Enrichissement du moût en azote ammoniacal.

II. — Mode d'action de l'azote ammoniacal.

III. — Enrichissement du moût en azote aminé.

IV. — Assimilation azotée en présence d'éthanal et d'acide pyruvique.

V. — Conclusions.

CHAPITRE IV

FACTEURS DE CROISSANCE DES LEVURES

I. — Besoins en facteurs de croissance des levures de vin cultivées en milieu synthétique.

II. — Influence de l'enrichissement du moût de raisin en facteurs de croissance.

a) Efficacité de la thiamine.

b) Mode d'action de la thiamine.

III. — Conclusions.

CHAPITRE V

ACTIVEURS DE LA FERMENTATION D'ORIGINE FONGIQUE

I. — Action de l'acteur d'*Aspergillus niger* sur la fermentation alcoolique

II. — Présence de l'acteur de Nielsen dans les myceliums de *Botrytis* et de *Penicillium*.

III. — Conclusions.

DEUXIÈME PARTIE

INHIBITEURS DE LA CROISSANCE DES LEVURES ET DE LA FERMENTATION ALCOLIQUE

CHAPITRE VI

ACTION DES ANTISEPTIQUES SUR LES LEVURES

I. — L'anhydride sulfureux.

a) Influence du sulfitage du moût sur la formation d'éthanal.

b) Conditions du mutage.

- II. — **Limites d'efficacité de certaines substances antiseptiques.**
- III. — **Essai des sulfamides sur les levures.**
- IV. — **Essai des sels d'ammonium quaternaire.**
 - a) Expérimentation des sels d'ammonium quaternaire sur la fermentation.
 - b) Mode d'action des sels d'ammonium quaternaire.
- V. — **Découverte de produits très actifs sur les levures parmi les antifongiques de synthèse.**
- VI. — **Conclusions.**

CHAPITRE VII

ACTION DES ANTIBIOTIQUES ANTIFONGIQUES SUR LES LEVURES

- I. — **Isoantagonisme.**
- II. — **Antagonisme levures — bactéries et levures — champignons.**
- III. — **Microorganismes producteurs de substances antifongiques et antilevures.**
- IV. — **Action des antibiotiques des premier et deuxième groupes.**
- V. — **Action des antibiotiques du troisième groupe.**
- VI. — **Conclusions.**

CHAPITRE VIII

FORMATION PAR BOTRYTIS CINEREA D'UN ANTIBIOTIQUE AGISSANT SUR LES LEVURES

- I. — **Essais de fermentation des moûts botrytisés.**
 - a) Enrichissement des moûts botrytisés en certains éléments.
 - b) Action des diverses sécrétions fongiques.
 - c) Action de l'anhydride sulfureux.
- II. — **Essais de séparation et de purification de la botryticine.**
 - a) Extraction par solvants.
 - b) Précipitation par l'alcool éthylique.
 - c) Solubilité de la botryticine dans le moût.
 - d) Degré alcoolique optimum de floculation de la botryticine.
 - e) Précipitations successives par l'alcool des substances inhibitrices.
 - f) Conservation des préparations alcooliques de botryticine.
 - g) Action de divers facteurs sur les fermentations en présence de botryticine.

III. — Extraction de la botryticine par le charbon activé.

- a) Adsorption de la botryticine des moûts pourris sur charbon activé.
- b) Elution du charbon activé.
- c) pH optimum d'extraction de la botryticine par le charbon activé.
- d) Purification des préparations de botryticine.
- e) Précipitation par l'alcool suivie d'une adsorption sur charbon activé.
- f) Adsorptions sur charbon activé et éluions successives.
- g) Dialyse du moût pourri.
- h) Adsorption sur phosphate tricalcique.

IV. — Production d'inhibiteurs de la fermentation par diverses souches de moisissures.**V. — Conditions de production de la botryticine.**

- a) Influence des conditions de pH du milieu de culture.
- b) Nature et composition du milieu nutritif.
- c) Influence de l'âge de la culture

VI. — Conditions optima d'efficacité de la botryticine.

- a) Efficacité de la botryticine en fonction du pH des milieux de fermentation.
- b) Efficacité de la botryticine suivant la nature du sucre fermenté.
- c) Efficacité de la botryticine en présence des facteurs de croissance.
- d) Conclusions.

Conclusions générales.**Bibliographie.**

INTRODUCTION

La fermentation alcoolique du moût de raisin est un phénomène singulièrement complexe. Nous sommes loin de connaître exactement l'incidence sur son déroulement de toutes les conditions extérieures et de la composition du milieu. Il existe beaucoup de faits inconnus. Les résultats apportés par l'étude de la fermentation au laboratoire trouvent des applications immédiates dans la pratique de la vinification. Certes, les procédés empiriques mis en œuvre par les praticiens permettent l'obtention de vins de grande qualité et d'excellente tenue. Mais parfois aussi, ces mêmes techniques sont impuissantes devant les multiples « accidents » de fermentation ou de refermentation. Il semble que beaucoup de ces difficultés pourraient être évitées, si on savait à coup sûr, pour un jus de raisin donné, accélérer ou arrêter à volonté sa fermentation.

Le problème est difficile : le jus de raisin est pour les levures un milieu nutritif en général très riche, mais de composition très variable suivant le cépage, l'année, la région, les modalités de préparation. On ne connaît pas d'ailleurs avec précision les teneurs en les divers facteurs de croissance des moûts de raisin. Le remède à une insuffisante activité des levures dans un moût ne consiste pas, forcément, à ajouter à celui-ci de fortes quantités de phosphate d'ammoniaque, selon la thérapeutique autorisée, car il peut être suffisamment pourvu en azote ammoniacal, ou à le soumettre à une aération qui n'est efficace qu'autant que les levures trouvent dans le milieu les facteurs nutritifs nécessaires.

D'autre part, arrêter les levures en pleine activité dans leur milieu de prédilection, et stabiliser définitivement ce dernier, pose un problème encore plus délicat : la levure est une cellule particulièrement résistante, supportant aisément des écarts de pH de 2,5 à 8,5, des concentrations en alcool de 12, 15 et même 18 p. 100 en volume. C'est une des cellules qui paraît être la mieux armée contre les antiseptiques. L'acide sulfureux, à forte dose, parvient à l'inhiber, mais d'une manière nullement irréversible ; encore connaît-on les inconvénients et les abus qu'entraîne son emploi.

Nous avons cherché à reconsidérer ces problèmes en leur apportant les données des connaissances récentes de la biochimie et une expérimentation méthodique.

Dans le premier chapitre, nous décrivons les milieux de culture et les techniques utilisés au cours du présent travail.

Notre exposé se divise ensuite en deux parties.

Dans la première partie, nous cherchons à préciser le mode d'action de certains facteurs connus pour leurs propriétés activantes sur la croissance des levures et la vitesse de la fermentation : l'aération, surtout dans le but de préciser le moment où elle doit être effectuée (chapitre II) ; la nutrition azotée (chapitre III) ; les vitamines, après une étude des besoins en facteurs de croissance de quelques levures types isolées des moûts du Bordelais (chapitre IV) ; enfin certains produits d'origine fongique, étude qui met en évidence leur supériorité en tant qu'activateurs (chapitre V).

Dans la deuxième partie, après un rappel des conditions rationnelles de l'emploi de l'acide sulfureux en vinification, et des effets d'autres substances antiseptiques connues, nous cherchons un produit de substitution ou de renforcement de l'acide sulfureux parmi les antiseptiques nouveaux, tels les sels d'ammonium quaternaire, certains produits fongicides de synthèse (chapitre VI) et les antibiotiques antifongiques (chapitre VII). Ces derniers ont particulièrement retenu notre attention par la puissance inhibitrice et la spécificité de certains d'entre eux vis-à-vis de levures bien déterminées.

Nous exposons enfin dans le chapitre VIII, les recherches poursuivies sur la fermentation des moûts botrytisés, qui nous ont amenés à conclure à la formation par le *Botrytis cinerea* d'une substance antilevure, la botryticine.

CHAPITRE PREMIER

MILIEUX, MATÉRIEL ET TECHNIQUES UTILISÉS

Pour connaître l'action sur la fermentation alcoolique du moût de raisin d'un facteur activant ou inhibiteur, on compare la marche de la fermentation en sa présence à celle d'une fermentation témoin se déroulant dans les mêmes conditions expérimentales, mais en l'absence de ce facteur. Diverses mesures sont nécessaires pour saisir l'ensemble du phénomène. Il importe autant en effet, de connaître la multiplication des levures et leur comportement dans le milieu que la vitesse de la transformation du sucre.

Nous traiterons successivement des conditions expérimentales, milieux et matériel que nous avons été amenés à adopter et des techniques utilisées pour suivre les divers phénomènes fermentatifs. Nous exposons, dans le chapitre qui leur est réservé, les méthodes appliquées à l'étude des besoins en facteurs de croissance des levures.

I. — Milieux de fermentation

Nos essais tendant à des fins pratiques, nous avons le plus souvent possible choisi pour milieu d'expérience, un jus de raisin naturel prélevé au moment de la vendange dans le vignoble girondin. C'est, par exemple, un moût de raisins rouges légèrement coloré, titrant 200 g de sucre par litre, et conservé en bouteilles après une pasteurisation à 80° effectuée le jour même de la récolte. Très riche en aliments azotés et en vitamines, il permet, à l'état original, une fermentation alcoolique rapide et une bonne croissance des levures. D'autres essais ont été effectués avec des moûts de raisins blancs, ayant jusqu'à 235 g de sucre.

Nous avons étudié dans ces milieux l'influence des inhibiteurs et celle des activeurs, nous mettant ainsi volontairement, dans les conditions les plus défavorables à leur action.

Pour obtenir des arrêts de fermentation, nous avons enrichi ces moûts en sucre, soit par addition de saccharose soit en leur mélangeant un muté de 15° Baumé, désulfité au préalable par entraînement à la vapeur d'eau. Le milieu ainsi constitué est beaucoup moins fermentescible que le moût naturel.

Le milieu à base d'eau de levure convient généralement moins bien

à la fermentation alcoolique qu'un milieu naturel. La production des levures y est beaucoup plus faible que dans le jus de raisin et la vitesse de fermentation moins rapide. On prépare ce milieu en mélangeant 200 g de levure de boulangerie à 1 litre d'eau. On autoclave 15 minutes à 120°C. On filtre à chaud à travers un papier épais plissé ou de la pâte à papier, jusqu'à l'obtention d'une liqueur limpide. On ajoute alors le sucre et on enrichit le milieu en sulfate d'ammonium. On dilue enfin pour obtenir un milieu contenant 5 à 10 p. 100 d'eau de levure. A des concentrations plus fortes, le bouillon de levure gêne la fermentation.

Enfin, dans certains cas, nous avons expérimenté avec un milieu entièrement synthétique de composition suivante :

Saccharose pur	100 g
Sulfate d'ammonium	1 g
Asparagine cristallisée.....	2 g
Phosphate acide de potassium	2 g
Acide citrique	6 g
Cendres de levure de boulangerie.....	2 g

Ces produits sont dissous dans la quantité d'eau bidistillée suffisante.

On amène à pH 3,5 par addition de potasse concentrée. La présence d'acide citrique tamponne le milieu. On filtre ; on ajoute les facteurs de croissance suivants :

Biotine	20 γ
Mésoinositol	10 mg
Thiamine, pyridoxine, acide nicotinique, acide pantothénique, acide p.aminobenzoïque, chacun.....	0,2 mg

On complète à un litre avec de l'eau bidistillée.

II. — Levures utilisées

La fermentation de ces divers milieux stérilisés est toujours provoquée par un ensemencement très faible, à l'aide de quelques gouttes d'un levain âgé de 2 à 3 jours d'une souche pure de levures.

L'importance de la valeur de l'ensemencement sur la vitesse et la durée de la fermentation est bien connue. Des essais ont montré qu'une fermentation s'amorce, par exemple, après 5 jours d'incubation et dure 8 jours avec un ensemencement de l'ordre de 1 à 25 levures par mm³ ; mais elle commence pratiquement sur le champ et dure seulement 3 jours, si on ensemence avec 200 000 levures par mm³. Mais quelle que soit la concentration levurienne au départ, dans d'assez larges limites, le nombre des levures en fin de fermentation et leur poids sont sensiblement les mêmes, pour un jus de raisin donné et dans des conditions expérimentales déterminées. Dans nos essais, les fermentations sont toujours soumises, en effet, à un facteur limitant, oxygène ou élément nutritif.

L'ensemencement, tel que nous l'effectuons généralement, avec une centaine de levures par mm^3 , provoque une période de latence de 24 heures environ. D'autre part, les variations de population totale et de vitesse de fermentation, dues au facteur en étude, sont toujours appréciées par rapport à un témoin.

Nous avons eu à notre disposition, dans cette étude, les levures de la collection de la Station Œnologique. Les souches qui la composent au nombre de plusieurs centaines, proviennent des prélèvements effectués dans les diverses régions vinicoles de la Gironde au moment des vendanges (1). Les différents genres et espèces de levures ayant un intérêt œnologique y sont représentés. D'autre part, certaines levures nous ont été fournies par l'Institut de Microbiologie de Pérouse (Professeur T. CASTELLI).

Les caractères de ces levures nous sont connus exactement par les travaux d'identification qui ont servi à leur classification, et par les analyses détaillées des milieux après fermentation. Elles sont conservées par repiquages fréquents, croisés en milieux solide et liquide.

Nos essais ont surtout été conduits avec deux *Saccharomyces ellipsoideus*, la souche n° 41 provenant d'un moût de Sauternes et la souche n° 51 prélevée à Saint-Emilion, choisies pour leur pouvoir fermentatif moyen.

III. — Température d'incubation

Des essais de fermentation conduits à des températures comprises entre 20 et 35°C ont montré que pour les *Saccharomyces* les températures optima de fermentation se situent entre 25 et 30°C. A température plus élevée la croissance des levures est augmentée et la vitesse de fermentation est plus grande dans les premiers jours d'incubation, mais elle s'arrête très vite, laissant du sucre non fermenté dans le milieu. A la température de 20°C, la vitesse de fermentation est très lente, mais de plus grandes proportions de sucre sont transformées. D'autre part, les variations de température pendant la fermentation peuvent en modifier profondément le cours : en règle générale, la fermentation est toujours plus rapide et plus complète lorsque la température à laquelle elle se déroule, est maintenue constante (2).

En conséquence, sauf pour les essais où précisément le facteur température était étudié, nous avons choisi la température constante de 25°C pour notre étude.

IV. — Conditions d'aération

Les fermentations aérobies sont conduites dans des flacons incomplètement pleins, simplement bouchés d'un tampon d'ouate. L'inconvénient est qu'on ne connaît pas exactement la quantité d'air ainsi introduite et que l'évaporation est importante.

Les conditions d'anaérobiose sont obtenues par un dispositif très simple, remplaçant le barboteur classique et évitant toute entrée d'air. Il est constitué par un bouchon de liège paraffiné ou de caoutchouc, percé d'un trou dans lequel est adapté un tube de verre très effilé et rempli d'ouate. Le dégagement continu du gaz carbonique et la ténuité des surfaces d'échange dans l'effilure interdisent toute pénétration d'air au cours de la fermentation.

Les flacons obturés de ces deux manières peuvent représenter, à l'échelle du laboratoire, les cuves ouvertes et les cuves fermées qu'on rencontre dans la pratique des cuviers. Sans doute, bien des facteurs de la vinification en cuves de 100 hl et 200 hl échappent à l'expérimentation en flacons de 100 cm³ à 750 cm³. Mais les faits observés au laboratoire ont pu être confirmés dans des essais reproduits sur de gros volumes. Cependant on doit considérer que l'expérimentation au laboratoire réalise des conditions extrêmes. L'anaérobiose y est plus poussée que dans la pratique, les aérations y sont également plus fortes. On devra en tenir compte dans l'extrapolation des résultats aux conditions de la pratique.

V. — Détermination de l'évolution de la fermentation

Différents procédés peuvent être employés pour déterminer la marche de la fermentation. Nous en avons utilisé deux, choisis pour leur rapidité et la précision satisfaisante de leurs résultats ; dosage des sucres réducteurs contenus dans le milieu et pesées du gaz carbonique dégagé par la fermentation.

a) **Dosage des sucres réducteurs.** — Ce dosage est effectué avec la liqueur de Fehling, après dilution convenable et décoloration par la quantité de charbon activé juste nécessaire.

La technique s'applique au cas de fermentations pour lesquelles on dispose d'un volume suffisant ; elle est précise, mais elle oblige à ouvrir les flacons d'expérience en prenant les précautions nécessaires pour éviter les contaminations, et à faire des prélèvements de liquide qui risquent finalement de modifier les conditions de fermentation.

b) **Pesées du gaz carbonique dégagé.** — Le procédé consiste simplement à peser au milligramme près les flacons d'expérience à intervalles déterminés. La perte de poids observée est due au gaz carbonique dégagé et aussi à une légère évaporation du liquide. Il n'est possible de suivre de cette façon que des fermentations anaérobies. Le dispositif d'obturation par tubes effilés diminue l'évaporation au minimum. Nous joignons, du reste, à la série des flacons en essai, un flacon contenant le même milieu non ensemencé et soumis aux mêmes conditions expérimentales ; sa perte

de poids chiffre la valeur moyenne de l'évaporation dans chaque flacon. La perte par évaporation atteint à peine 1 p. 100 du poids du gaz carbonique dégagé. La technique ne peut s'appliquer qu'à des essais effectués sur de petits volumes, flacons contenant 50 cm³ de moût, ou encore tubes à essai contenant 10 à 15 cm³ de liquide.

Du poids de gaz carbonique dégagé, on peut calculer approximativement, si on le désire, le poids de sucre fermenté par litre. D'après PASTEUR, le sucre donne en fermentant 46 p. 100 de son poids de gaz carbonique. On fera le calcul de la façon suivante :

$$\text{Sucre fermenté par litre} = \frac{(\text{Perte de poids} - \text{perte par évaporation}) \times 100}{46}$$

Ces résultats sont bien entendu approximatifs, mais ils ont une valeur comparative. Cette technique a l'inconvénient d'être limitée aux conditions d'anaérobiose et d'interdire un prélèvement dans les flacons en cours d'expérience. Elle ne permet pas de suivre la croissance des levures. Par contre elle permet d'aller très vite en utilisant la balance Mettler à un seul plateau. Il est alors possible d'envisager l'étude simultanée d'un grand nombre de facteurs, ce qui ne pourrait pas être réalisé par dosage chimique des sucres.

Parfois les cas intéressants signalés par ce procédé ont été repris et suivis par un dosage précis des sucres en vue d'une étude plus approfondie.

VI. — Mesure de la croissance des levures

On dispose de plusieurs techniques pour évaluer la population des levures d'un milieu (3). Par néphélométrie, c'est-à-dire en mesurant dans des conditions précises l'absorption lumineuse par une culture sous une certaine épaisseur, on obtient des données dont la précision peut être suffisante. On sait qu'il existe en effet, entre certaines limites, un rapport entre l'intensité du trouble et le poids ou le nombre des cellules en suspension. Mais certains phénomènes fermentaires exigent pour leur interprétation la connaissance du nombre des levures vivantes et capables de se multiplier, à côté de leur nombre total dans le milieu. L'hématimètre permet de compter la totalité des levures, mais ne nous renseigne pas sur leur état. Les cellules vivantes pourraient être décelées par la coloration directe des préparations au moyen des colorants basiques. Ces colorants pénètrent seulement dans les cellules mortes. Toutefois, ces méthodes de coloration sont délicates et leurs résultats souvent douteux. Nous leur avons préféré la numération des colonies formées en milieu nutritif solide.

a) **Numération des cellules totales à l'hématimètre.** — Le compte-globules de Malassez, d'un usage courant en hématologie, est une chambre

graduée, enchâssée dans une plaque métallique. L'épaisseur du liquide est réglée à $1/5$ de mm par trois vis faisant saillie, sur lesquelles vient s'appuyer la lamelle. Le quadrillage visible au microscope est formé de rectangles eux-mêmes composés de 20 petits carrés. Chaque rectangle correspond à $1/100$ de mm^3 .

Pour faciliter le dénombrement des cellules, l'échantillon à observer est dilué de façon à ramener le nombre de levures à une cinquantaine dans chaque rectangle. C'est au voisinage de cette concentration que la numération a le plus de chance d'être exacte. On est ainsi amené à faire des dilutions au cinquième dans les premiers jours de la fermentation, au dixième en fin de fermentation ou au vingtième pour les fermentations aérobies.

Le prélèvement de l'échantillon s'effectue aseptiquement après avoir longuement agité le liquide pour mettre ses levures en suspension. On dilue et on agite à nouveau. On laisse tomber d'une pipette les deux premières gouttes de cette préparation à l'extérieur, puis les deux suivantes dans la chambre graduée du compte-globules, sans la toucher avec la pointe de la pipette. Il faut opérer rapidement, sinon les levures tendent à s'accumuler à l'extrémité inférieure de la pipette et la numération serait faussée par excès. On rabat le compresseur sur lequel on a fixé la lamelle en le mouillant légèrement.

On place le compte-globules sur le chariot d'un microscope. Un grossissement de 300 à 400 permet d'avoir un rectangle entier de la chambre graduée dans le champ de l'objectif et une bonne visibilité des cellules. On déplace le chariot rapidement pour examiner la distribution des cellules dans la chambre entière et vérifier qu'on n'a pas introduit de bulles d'air. Les levures se déposent très vite. Si elles paraissent également réparties, on les compte dans 4 ou 5 rectangles. On retient la moyenne de ces numérations.

On obtient ainsi très rapidement et à 5 p. 100 près environ, le nombre total des levures contenues dans $1/100$ de mm^3 du liquide en fermentation. On exprime la population en milliers par mm^3 .

b) Numération des cellules vivantes sur milieu nutritif solide. — En milieu nutritif solide sur boîte de Pétri, seules les levures susceptibles de se reproduire formeront des colonies. Les colonies comptées correspondent donc au nombre des cellules vivantes.

On calcule approximativement les dilutions de manière à compter au maximum une cinquantaine de colonies par boîte. On réalise ces dilutions au moyen de flacons contenant 99 cm^3 d'eau distillée stérile. Dans les premiers jours de la fermentation les dilutions au $1/1\ 000\ 000$ sont nécessaires, puis au $1/100\ 000$ et au $1/10\ 000$. En fin de fermentation une dilution au $1/100$ suffit le plus souvent.

On prélève un petit volume du liquide en fermentation aseptiquement et après agitation du liquide comme précédemment. Dans le cas où les deux techniques de numération sont employées, on utilise le même échantillon. Avec des pipettes stériles graduées à 1 cm³ et 0,1 cm³, on dilue convenablement la prise d'essai, utilisant pour cela successivement un, deux ou trois flacons d'eau stérile. 1 cm³ du dernier flacon, au préalable fortement agité, est ajouté à un tube contenant 10 cm³ de moût stérile. On homogénéise l'ensemencement en roulant verticalement le tube entre les deux mains. On verse dans une boîte de Pétri stérile et on ajoute aussitôt 10 cm³ de gélatine à 20 p. 100, liquéfiée à 40°C, en évitant de trop soulever le couvercle. On mélange en faisant glisser la boîte d'un mouvement circulaire, avec précaution, sur une surface bien horizontale et on laisse refroidir. Après solidification du milieu on porte les boîtes à l'étuve à 20°C. Après 4 à 10 jours on peut compter les colonies formées.

Les dilutions successives nécessitées par cette méthode augmentent les causes d'erreur. 10 p. 100 est la précision maximum à laquelle on puisse prétendre ⁽¹⁾.

Ces techniques de numération nous ont permis de saisir plusieurs états de la cellule de levure, avec, bien entendu, tous les intermédiaires possibles :

1° Levures en pleine activité, capables de former rapidement des colonies en milieu nutritif solide.

2° Levures vivantes, mais à l'état de vie ralentie : les colonies sur boîte de Pétri apparaissent après une longue période d'incubation.

3° Levures vivantes mais incapables de se reproduire et de donner naissance à des colonies, mais qui, sous l'effet d'une aération par exemple, peuvent à nouveau retrouver la faculté de se multiplier.

4° Enfin, levures mortes, livrées à l'autolyse.

PREMIÈRE PARTIE

ACTIVEURS DE LA CROISSANCE DES LEVURES ET DE LA FERMENTATION ALCOLIQUE

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'AÉRATION

L'importance de l'aération sur la fermentation du moût de bière fut reconnue par PASTEUR qui montra que l'oxygène est nécessaire à la multiplication des levures (4). L'oxygène joue un rôle encore plus important

⁽¹⁾ Il arrive, surtout dans la première phase de la fermentation, que le nombre des levures vivantes ainsi trouvées, dépasse légèrement le nombre des levures totales déterminées à l'hématimètre. Il est probable, en effet, que l'agitation violente dans les flacons à dilution et l'addition de gélatine chaude favorisent la séparation des cellules qui bourgeonnent.

dans la vinification. Dans la pratique, la fermentation doit être rapide et complète. Dans la vinification en rouge en particulier, elle doit se terminer en 8 à 10 jours et ne pas laisser de sucre fermentescible. Ceci exige une bonne croissance des levures et le facteur activant primordial est l'oxygène.

J. RIBÉREAU-GAYON (5) a décrit en 1945 une expérience très simple qui met en évidence l'action de l'air au cours de la fermentation du moût de raisin. Nous l'avons reproduite au laboratoire de nombreuses fois. On fait fermenter à 25°C deux flacons contenant un même volume d'un même moût. L'un est bouché d'un tampon d'ouate, l'autre d'un bouchon percé d'un tube effilé rempli de coton. On suit la marche des fermentations et on procède journellement à la numération des cellules totales et des cellules vivantes.

La première partie du tableau I rassemble quelques uns des résultats obtenus.

En milieu aéré, tout le sucre est fermenté en 10 jours. Le maximum de la population est atteint 5 jours après l'ensemencement, avec 85 000 levures actives par mm³. Ces chiffres se retrouvent presque exactement au dixième jour de la fermentation. Les levures restent capables de se multiplier jusqu'à la complète transformation du sucre. La diminution du nombre des cellules pouvant former une colonie en milieu solide s'amorce dès que le sucre a disparu. En 5 jours, le nombre des levures vivantes passe de 60 à 4 unités par millièbre de mm³. Un mois après, l'autolyse a détruit 50 p. 100 du nombre total des levures, et 70 par mm³ seulement sont encore réellement actives.

La fermentation est beaucoup plus lente à l'abri de l'air et laisse 28 g de sucre non fermenté dans le milieu après un mois. Au cinquième jour de la fermentation, la population levurienne totale a atteint un plafond de 42 000 cellules par mm³. Toutes sont actives. Au huitième jour, alors que le milieu a encore 50 g de sucre par litre, le nombre de levures relevé à l'hématimètre est identique au précédent, mais la moitié seulement de ces levures peuvent former des colonies sur milieu solide. Dès lors, la marche de la fermentation ralentit. 15 jours après l'ensemencement, le nombre des cellules vivantes est devenu très faible et la transformation du sucre reste incomplète.

En résumé, la fermentation est rapide et complète en aérobiose. Elle est beaucoup plus lente et s'arrête avant que tout le sucre ne soit transformé en anaérobiose. Les conditions d'aérobiose agissent aussi sur la croissance des levures : non seulement elles doublent leur nombre, mais encore elles prolongent leur période de vie active. En réalité, la phase de multiplication logarithmique des cellules dans un moût en fermentation est relativement courte. Elle est suivie, aussitôt, d'une phase de diminution du nombre des levures capables de former des colonies en milieu solide,

et cette phase paraît être aussi rapide que la phase de pleine croissance. En milieu aéré, l'« inanition » des cellules ne commence que lorsque tout le sucre est fermenté. En l'absence d'air le phénomène s'amorce au moment où le milieu contient encore de fortes quantités de sucre, et on conçoit que la fermentation s'arrête avant l'épuisement total du sucre.

I. — Influence de l'aération en cours de fermentation

Dans la vinification en cuve de grande capacité, telle qu'on la pratique pour les vins rouges de Bordeaux, pour éviter les arrêts de fermentation, on procède à des remontages. Le remontage consiste en une aération effectuée en faisant couler le vin en fermentation de la cuve dans un récipient, d'où le liquide est repompé dans le haut de la cuve. Cette pratique déjà courante au XVIII^e siècle selon LABORDE (6), généralisée par GAYON (7) dans le Bordelais après 1893, est souvent utilisée de manière empirique. Nous avons montré que pour être vraiment efficace le remontage doit s'effectuer dans les tout premiers jours de la fermentation (8). Voici une nouvelle expérience qui le démontre d'une manière encore plus formelle.

On fait fermenter à 25°C une série de flacons contenant un moût de 13° Baumé. L'un d'eux est obturé par un tampon d'ouate, et les quatre autres par des bouchons percés de tubes effilés. L'un de ces derniers fermentera continuellement à l'abri complet de l'air ; le liquide de chacun des trois autres est saturé d'oxygène, respectivement les deuxième, quatrième et huitième jours après l'ensemencement. Pour cela, on agite pendant 3 minutes le liquide dans une fois son volume d'air. Dans ces conditions, la dissolution de l'oxygène peut être estimée à 6 cm³ environ par litre. On suit la marche des fermentations par dosage du sucre et numération des levures à l'hématimètre et en milieu nutritif solide. Le tableau I reproduit ces résultats.

Huit jours après l'ensemencement, tout le sucre est transformé dans le flacon fermentant à l'air.

Le nombre de levures totales est alors maximum et correspond au nombre de cellules réellement vivantes. Au même moment, dans le milieu privé d'air, le nombre de cellules actives n'est plus que la moitié de la population totale. La phase de fermentation rapide est terminée, le milieu titre encore 48 g de sucre, 23 g seront encore transformés pendant les vingt-cinq jours suivants, mais 25 g restent finalement après fermentation dans ce milieu.

L'introduction d'air au deuxième jour intervient au moment où les levures sont dans la phase de multiplication logarithmique et en pleine activité : huit jours après, la totalité du sucre est transformée. L'apport d'oxygène a permis une fermentation dont le rythme et le comportement des cellules sont typiquement aérobies.

TABLEAU I

Influence de l'aération en cours de fermentation

Sucre restant en g par litre

Levures par 1/100 de mm³

		Après 2 jours	Après 3 jours	Après 7 jours	Après 9 jours	Après 12 jours	Après 17 jours	Après 30 jour
<i>Aération continue</i>	<i>Sucre restant</i>	161	131	22	11	2	—	—
	Levures totales.....	35	50	83	78	76	74	58
	Levures vivantes	33	55	86	90	60	4	0,7
<i>Anaérobiose</i>	<i>Sucre restant</i>	191	172	54	48	39	31	28
	Levures totales.....	12	31	42	41	39	39	32
	Levures vivantes	10	27	32	25	16	3	0,3
<i>Anaérobiose</i>	<i>Sucre restant</i>	191	135	27	15	10	2	—
Aération au 2 ^e jour	Levures totales	13	48	77	72	69	69	48
	Levures vivantes	15	58	84	90	45	3	0,3
<i>Anaérobiose</i>	<i>Sucre restant</i>			55	41	26	20	19
Aération au 4 ^e jour	Levures totales			45	51	39	39	35
	Levures vivantes.....			45	39	24	4	0,6
<i>Anaérobiose</i>	<i>Sucre restant</i>				63	34	27	27
Aération au 8 ^e jour	Levures totales				40	38	36	30
	Levures vivantes.....				20	30	3	0,2

L'aération au quatrième jour se fait dans un liquide déjà riche en alcool, où 15 p. 100 des levures visibles à l'hématimètre ne sont déjà plus susceptibles de se développer. Deux jours après l'introduction d'air, le nombre des cellules vivantes est cependant augmenté de 12 p. 100. La marche de la fermentation est accélérée : en 2 jours, 37 g de sucre sont fermentés pour 26 g dans le témoin anaérobie. Mais au neuvième jour s'amorce une nouvelle diminution du nombre des cellules actives et le liquide gardera 22 g de sucre non transformé.

Dans le milieu qui reçoit une addition d'air au huitième jour de sa fermentation, 50 p. 100 des levures sont déjà inactives. Dans les trois jours qui suivent l'aération, le nombre des cellules capables de former des colonies augmente sensiblement, mais n'atteint jamais que 78 p. 100 du nombre total. Puis suit une nouvelle et rapide diminution du nombre des levures vivantes.

II. — Variation du potentiel d'oxydo-réduction en cours de fermentation

Considérons une solution renfermant une ou plusieurs substances en partie sous leur forme réduite, en partie sous leur forme oxydée, la transformation d'une forme en l'autre étant réversible. C'est un fait d'expérience que si on relie par un fil conducteur une lame de platine placée dans cette solution à une électrode d'hydrogène ou à une électrode au calomel, les liquides étant mis en communication par un pont de jon-

tion, le fil conducteur est traversé par un courant électrique. Lorsqu'il ne passe pas de courant, la différence de potentiel aux bornes de la pile ainsi constituée, est une fonction simple des proportions dans lesquelles se trouvent les formes réduites et oxydées, c'est-à-dire de l'état d'oxydo-réduction du milieu.

Nous avons utilisé pour ces mesures, le potentiomètre Quéré, appareil donnant en lecture directe le potentiel d'oxydo-réduction en millivolts.

Pour obtenir des lectures fidèles, il est indispensable que l'électrode de platine soit en équilibre avec le milieu. A cet effet l'électrode demeure plongée en permanence dans le liquide pendant tout le cours de la fermentation. Il suffit de brancher l'électrode sur l'appareil de mesure et d'introduire un pont de jonction contenant l'électrode au calomel jusqu'au contact du liquide, pour faire les mesures sans aucune manipulation de celui-ci.

Le potentiel d'oxydo-réduction a été ainsi mesuré au cours de la fermentation dans les diverses conditions précitées pour un moût titrant 14° Baumé, ensemencé avec une levure elliptique. Le graphique I donne les courbes obtenues.

a) Variations du potentiel dans des fermentations conduites à l'air et à l'abri de l'air. — En milieu aéré, le potentiel d'oxydo-réduction reste stationnaire pendant les deux jours de latence de la fermentation. Il atteint son minimum, ici 97 mv, au quatrième jour, après une chute brusque. A ce moment, les levures sont dans leur phase de plein développement et la moitié de la teneur en sucre est transformée. Le potentiel remonte ensuite progressivement à cause de l'introduction d'air, pour atteindre une valeur qui dépasse de beaucoup celle du potentiel initial.

En anaérobiose, après la phase stationnaire des premiers jours, la chute du potentiel s'effectue plus lentement. Du quatrième au neuvième jour, le potentiel passe de 175 à 95 mv. A ce moment, la population des levures vivantes est déjà en régression et les 5/6 du sucre sont fermentés. Le potentiel remonte ensuite lentement pour reprendre sa valeur initiale.

Dans les deux conditions d'aération, le potentiel d'oxydo-réduction minimum est du même ordre de grandeur.

b) Variations du potentiel dans un milieu aéré en cours de fermentation. — Au deuxième jour de sa fermentation, le milieu à l'abri de l'air accuse un potentiel de 260 mv. L'aération à ce moment, provoque une brusque montée à 403 mv. Ce potentiel décroît ensuite, rapidement pendant les premières heures, puis plus lentement, pour atteindre 24 heures après le traitement, un minimum de 115 mv.

Une aération au quatrième jour ou encore au huitième jour provoque des variations de potentiel tout à fait analogues : brusque remontée de 175 à 350 mv environ, suivie d'une chute pour atteindre 24 heures après le minimum de 115 mv. Dans les trois cas, le potentiel minimum est identique.

En outre, une aération effectuée dans un moût où tout le sucre a été transformé et qui contient encore toutes ses levures, provoque la même

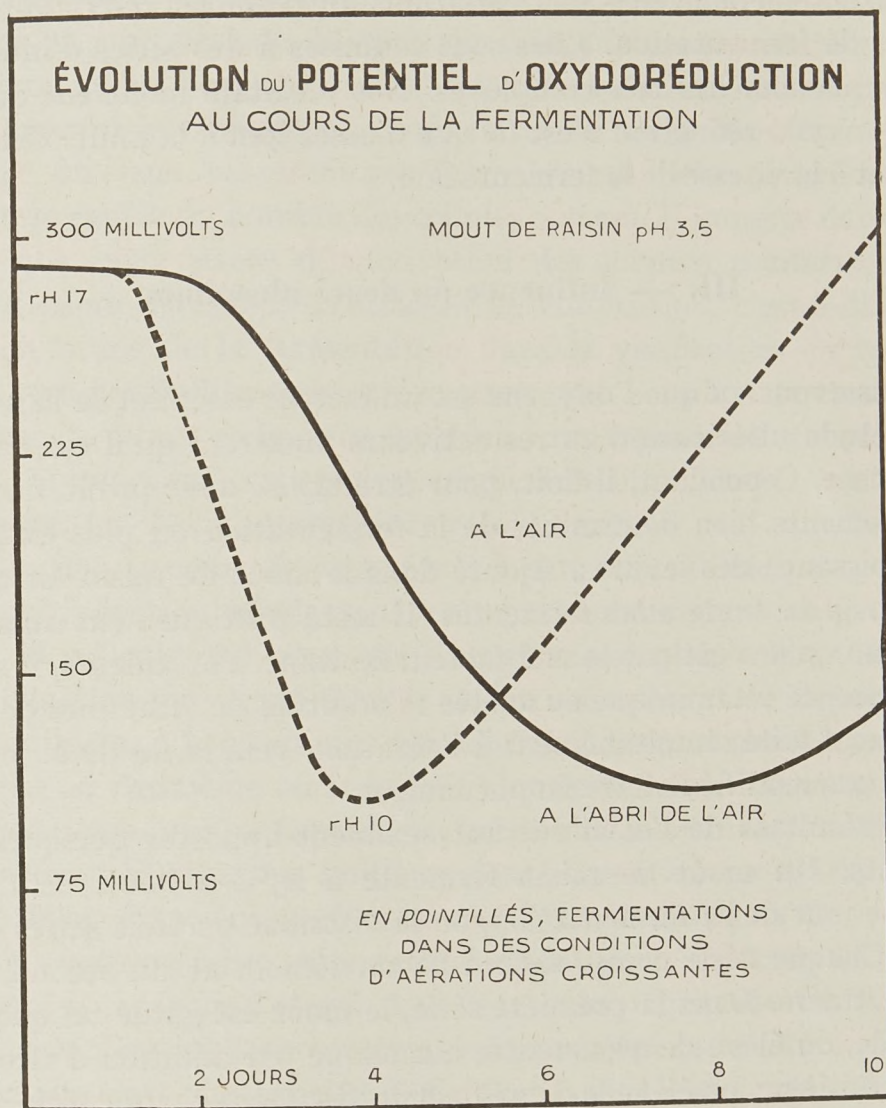


FIG. 1

montée brusque du potentiel, qui décroît ensuite pour revenir au niveau initial.

Comme cela a été constaté pour un grand nombre de microorganismes, il semble qu'il existe un certain parallélisme entre la croissance des levures et l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction. La diminution de ce potentiel correspond à la phase de multiplication logarithmique des levures. Mais si, en présence d'air, la valeur limite du potentiel est atteinte au moment où la population est à son maximum en nombre et en acti-

tivité, elle est atteinte plus tardivement, en anaérobiose, au moment où le nombre des levures vivantes diminue.

Donc le potentiel peut décroître sans pour cela indiquer une multiplication des levures. En réalité, le potentiel d'oxydo-réduction représenterait d'après HEWITT (9) : « l'état d'équilibre dynamique de la culture entre l'activité des enzymes dans la cellule et les constituants du milieu ». En définitive, en l'état actuel de nos connaissances, il est difficile d'interpréter exactement le sens des variations du potentiel d'oxydo-réduction en cours de fermentation. Elles sont soumises à des séries d'interactions et à des phénomènes très complexes. Nos résultats montrent que le potentiel d'oxydo-réduction n'est lié que d'assez loin à la multiplication des levures et à la vitesse de la fermentation.

III. — Influence du degré alcoolique

Nous avons vu que l'oxygène est un facteur essentiel de la fermentation. L'étude ultérieure d'autres activeurs montrera qu'il est de tous le plus efficace. Cependant, il doit, pour être utilisé avec profit, être fourni à des moments bien déterminés de la fermentation ou plus exactement de la croissance des levures. Ajouté dans le moût de raisin lorsque déjà 50 à 100 g de sucre sont fermentés, il reste pratiquement sans action. C'est donc qu'il n'est pas le seul facteur limitant. Par ailleurs, il ne s'agit pas de carence vitaminique ou azotée : l'addition de vitamines ou d'azote ammoniacal faite simultanément à l'aération, vers la fin de la fermentation, n'a pas modifié l'allure du phénomène.

Les résultats de l'essai suivant semblent apporter quelques éclaircissements. Un moût de raisin fermente à 25°C à l'abri de l'air. Au deuxième jour de sa fermentation, on le distribue en trois séries de deux flacons. Chaque série comprend un flacon témoin et un second dont le liquide est aéré. Dans la première série, le moût est gardé tel quel ; dans la seconde, on élève de 4° son titre alcoolique par addition d'alcool pur ; dans la troisième, on élève le degré de 8 unités. Dans chaque série, le degré alcoolique correspond en somme à celui du moût aéré au deuxième, quatrième et huitième jour de l'expérience précédente.

On constate que l'accélération de la fermentation provoquée par l'aération, faite pourtant au même moment, est d'autant moindre que le degré alcoolique est plus élevé. Dans les trois jours qui suivent l'aération, on enregistre une avance de 45 g de sucre fermenté dans la série témoin, de 6 g seulement dans la série alcoolisée à 4° et de 4 g dans la série alcoolisée à 8°. Le nombre des levures est augmenté de 29 000 dans le premier cas et de 5 000 et 6 000 dans les deux autres. Cet essai montre que c'est la richesse du milieu en alcool qui commande l'efficacité de l'aération.

Un degré élevé diminue l'activité des levures. En présence d'alcool, la protéosynthèse est ralentie et les levures ne peuvent pas bénéficier de l'oxygène qu'on leur offre.

IV. — Conclusions

Graphiquement, l'évolution du nombre des levures travaillant dans un moût de raisin en fermentation prend l'aspect d'une courbe en forme de cloche. A une période de croissance logarithmique succède une inflexion progressive vers un sommet qui correspond à l'intervention d'un facteur limitant la croissance : épuisement de l'oxygène, des facteurs de croissance, du sucre, inhibition par l'alcool formé. Cette période est suivie d'une chute rapide du nombre des cellules actives. Il importe dans la vinification que cette phase d'inactivation des levures n'intervienne que lorsque le sucre est épuisé. L'accident de vinification, c'est-à-dire l'arrêt avant son terme de la fermentation dans la vinification en rouge par exemple, est particulièrement grave parce que le milieu se trouve privé en très peu de temps de levures capables de se reproduire et de fermenter le sucre. On comprend cette règle pratique de la vinification : en cas d'arrêt de fermentation, il faut intervenir immédiatement.

L'aération en cours de fermentation agit donc, d'une part en favorisant la multiplication cellulaire, d'autre part en stimulant les levures déjà formées. Il est essentiel pour que l'oxygène soit pleinement utilisé, que son introduction parvienne dans le milieu au moment où il peut encore servir d'adjuvant à la croissance des cellules et à leur activité fermentaire, c'est-à-dire au deuxième ou troisième jour de la fermentation anaérobie. Dès le quatrième jour les levures réagissent plus faiblement, l'accélération produite est médiocre. Au huitième jour, l'aération est presque inefficace, ces délais étant envisagés pour une fermentation à 25°C.

Nous avons pu relier cette perte d'efficacité de l'aération en fonction du temps, à la présence d'alcool. Aux degrés alcooliques élevés, bien avant la perte de la fonction fermentative, la levure perd la faculté de se reproduire, car elle n'est plus capable d'effectuer la synthèse des protéides.

CHAPITRE III

NUTRITION AZOTÉE DES LEVURES

On peut envisager la croissance et la multiplication des levures comme une simple protéosynthèse. C'est dans la mesure où la levure peut utiliser l'azote du milieu que se règle la croissance cellulaire. On sait depuis Pasteur que dans un milieu synthétique approprié, la forme ammo-

niacale de l'azote peut suffire entièrement à la levure. Lorsque l'ammoniaque est en quantité plus faible, les levures assimilent les acides aminés présents. Grâce à des dosages d'acides aminés effectués sur le moût de bière et sur la bière correspondante, par des méthodes microbiologiques ou chromatographiques, les théories d'EHRlich (10) et de STICKLAND (11) ont été récemment revues par THORNE (12). D'après cet auteur, la levure est capable d'assimiler en nature de nombreux acides aminés du moût. Puis, lorsque le mélange restant n'est plus de composition satisfaisante, elle provoque leur désamination selon la réaction d'EHRlich, ou encore une transamination par oxydo-réduction des acides aminés donateurs et accepteurs d'hydrogène. Ces deux mécanismes ont pour effet de libérer l'ammoniaque, matière première nécessaire à la synthèse des protéines de la levure. Les peptides peuvent être ensuite assimilés, après hydrolyse en acides aminés. (Voir aussi à ce sujet BARTON-WRIGHT (13)).

Nous nous sommes attachés à étudier l'action sur l'évolution de la fermentation d'un enrichissement du moût en azote sous ses deux formes, ammoniacale et aminée.

I. — Enrichissement du moût en azote ammoniacal

Le phosphate biammonique est un activateur des levures dont l'emploi est autorisé en vinification. En réalité dans ce sel, contrairement à ce que pensaient ceux qui furent les promoteurs de cette pratique, l'acide phosphorique joue un rôle très secondaire et toute l'impulsion donnée à la fermentation est due à l'azote ammoniacal introduit.

Un moût titrant 215 g de sucre, 122 mg d'azote total et 11 mg d'azote ammoniacal est mis à fermenter à la température de 25°C, à l'air, avec une levure elliptique, après avoir reçu différentes doses d'acide phosphorique sous forme de phosphate monopotassique, ou d'ammoniaque sous forme de chlorure d'ammonium et de phosphate biammonique. Ces additions varient de 20 à 200 mg par litre, en chacun des éléments (PO_4) et (NH_4). On a tracé les graphiques 2 et 3 avec les résultats obtenus.

200 mg par litre d'anion phosphorique facilitent légèrement le départ de la fermentation, mais 12 jours après, la population des levures et la concentration en sucre restant sont absolument identiques dans ce milieu et dans le témoin.

50 mg par litre d'azote ammoniacal sous forme de chlorure, provoquent une accélération de la fermentation assez marquée, tandis que 100 mg doublent le poids du sucre fermenté en 24 heures. Le nombre total de levures est augmenté de 25 p. 100. Avec 200 mg par litre d'azote ammoniacal, les résultats sont sensiblement les mêmes.

A doses égales en azote ammoniacal, l'activation due au phosphate

d'ammoniaque est du même ordre de grandeur que celle observée en présence de chlorure.

D'autres auteurs avaient fait de semblables observations. SMYTHE en 1939 (14), WINZLER et ses collaborateurs en 1944 (15) ont montré que les sels d'ammonium activent la fermentation. MASSART et HEYMANS (16)

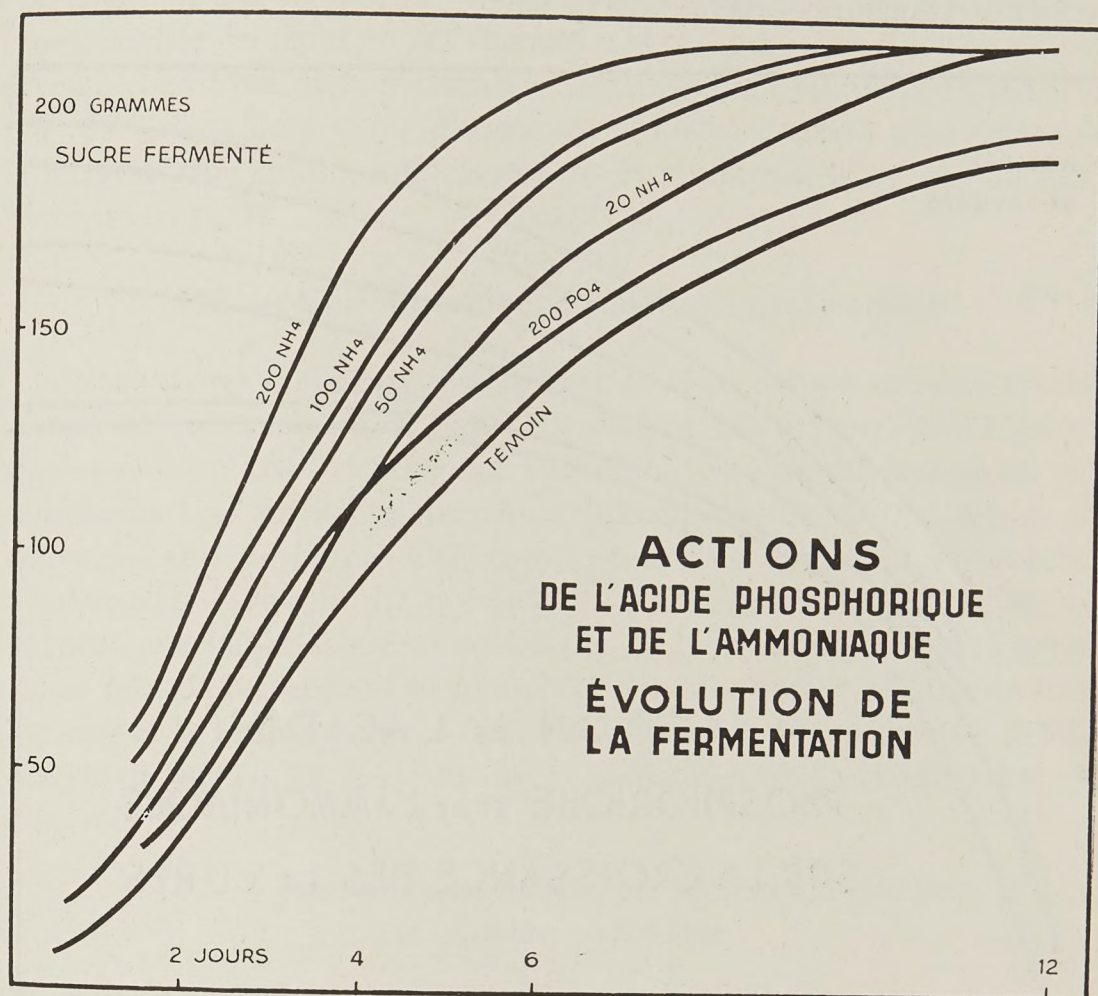


FIG. 2

observent que l'adjonction de sels ammoniacaux stimule les réactions productrices d'énergie, y compris la respiration. Enfin récemment, VALAIZE (17) a montré l'utilité de l'emploi des sels ammoniacaux en vinification.

II. — Mode d'action de l'azote ammoniacal

Un apport supplémentaire d'azote ammoniacal à un moût semble stimuler les levures davantage dans leur pouvoir fermentatif que dans leur multiplication. Parfois à un léger accroissement de population correspond une accélération très importante de la fermentation.

Nous avons étudié le comportement des levures dans une fermentation se développant en présence d'une addition d'azote ammoniacal de

100 mg par litre, en suivant le nombre des levures vivantes et la population totale. On voit que l'action de l'ammoniaque se manifeste assez tardivement. Le nombre total des levures est légèrement augmenté par rapport au témoin, mais surtout le moment à partir duquel elles ne peuvent plus se reproduire à l'abri de l'air est repoussé de 2 jours, ce qui leur permet de transformer davantage de sucre.

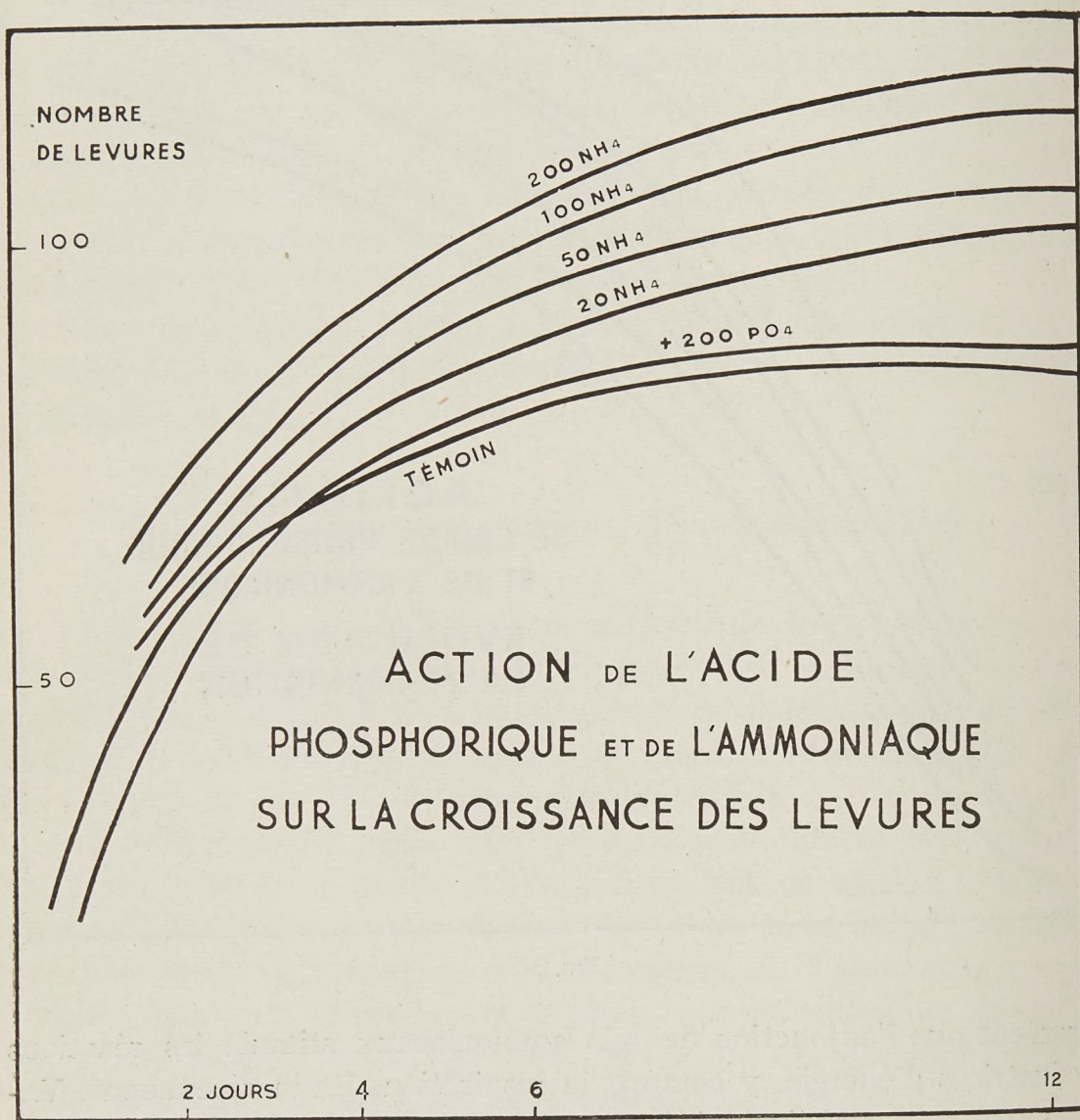


FIG. 3

Soulignons que la fixation d'azote ammoniacal par les levures se trouve nettement favorisée par une dissolution d'oxygène. Des dosages d'azote ammoniacal avant et après fermentation du jus de raisin ont montré que les levures pouvaient en utiliser jusqu'à 200 mg par litre lorsqu'elles travaillent à l'abri de l'air et 300 mg lorsqu'elles se développent à l'air. Dans un essai en particulier, les levures ont pu en consommer jusqu'à 735 mg par litre en aérobiose, sans que d'ailleurs leur nombre soit accru d'une manière comparable.

De nombreuses séries d'essais ont été réalisées au cours des vendanges 1951, 1952 et 1953 sur des moûts naturels fermentant spontanément avec leurs levures. Ils consistaient à suivre la fermentation du moût enrichi en azote ammoniacal par rapport à un témoin. On a observé que cette addition favorise toujours la fermentation du moût de raisin, mais l'accélération qui en résulte dépend évidemment pour une part de la richesse initiale du moût en cet élément. On sait que celle-ci est en rapport avec les conditions de la maturation. En 1953 par exemple, en règle générale, un apport de 100 mg d'azote ammoniacal a activé plus nettement la fermentation qu'un enrichissement en vitamines, alors que ce fut le contraire en 1951.

III. — Enrichissement du moût en azote aminé

Nous avons de même essayé l'action d'un certain nombre d'acides aminés ajoutés au moût de raisin à la dose de 100 mg par litre. L'asparagine se montre aussi rapidement assimilable et aussi efficace qu'un enrichissement égal en azote sous forme ammoniacale ; elle est même plus active à l'abri de l'air. Le glycolle constitue également un excellent aliment pour la levure. La cystéine, la cystine gauche, la d-alanine, provoquent une faible accélération à l'abri de l'air, tandis que le dl-tryptophane retarde légèrement la fermentation. La cystéine retarde de même légèrement la fermentation à l'air. Par ailleurs, le l-tryptophane, la l-leucine, la dl-leucine, la dl-isoleucine, la β -alanine, sont pratiquement sans effet.

IV. — Assimilation azotée en présence d'éthanal et d'acide pyruvique

L'éthanal et l'acide pyruvique sont, on le sait, des produits intermédiaires de la fermentation alcoolique. Ajoutés en petites quantités dans un moût, avant ou au cours de la fermentation, ils modifient les processus chimiques (18) et agissent non seulement sur la croissance des levures et la vitesse fermentaire, mais encore sur l'assimilation azotée de la cellule.

On fait fermenter à 25°C avec un *Saccharomyces ellipsoïdeus*, dans les deux conditions d'aération, un moût de raisin titrant 210 g de sucre, 253 mg d'azote total et 22 mg d'azote ammoniacal par litre. On le répartit en deux séries : une série témoin et une série enrichie par 150 mg d'azote ammoniacal par litre. Chacune d'elles comprend trois flacons : le premier constitue le témoin, les deux autres reçoivent dès le départ de la fermentation et pendant cinq jours consécutifs, chaque fois respectivement 14 mg par litre d'éthanal et 60 mg par litre d'acide pyruvique ; on utilise à cet effet son sel de sodium dont on libère l'acide par la quantité équivalente d'acide sulfurique.

On suit la marche de la fermentation et en fin de fermentation les levures sont comptées, puis séparées du milieu par centrifugation, lavées, recueillies sur filtre taré, séchées et pesées. On dose en outre l'azote ammoniacal restant dans le milieu et l'azote total des levures après attaque Kjeldahl.

Le graphique 4 exprime l'activation de la fermentation et de la croissance des levures obtenue par addition de petites quantités d'éthanal et d'acide pyruvique. Les traits pleins représentent l'évolution de la fer-

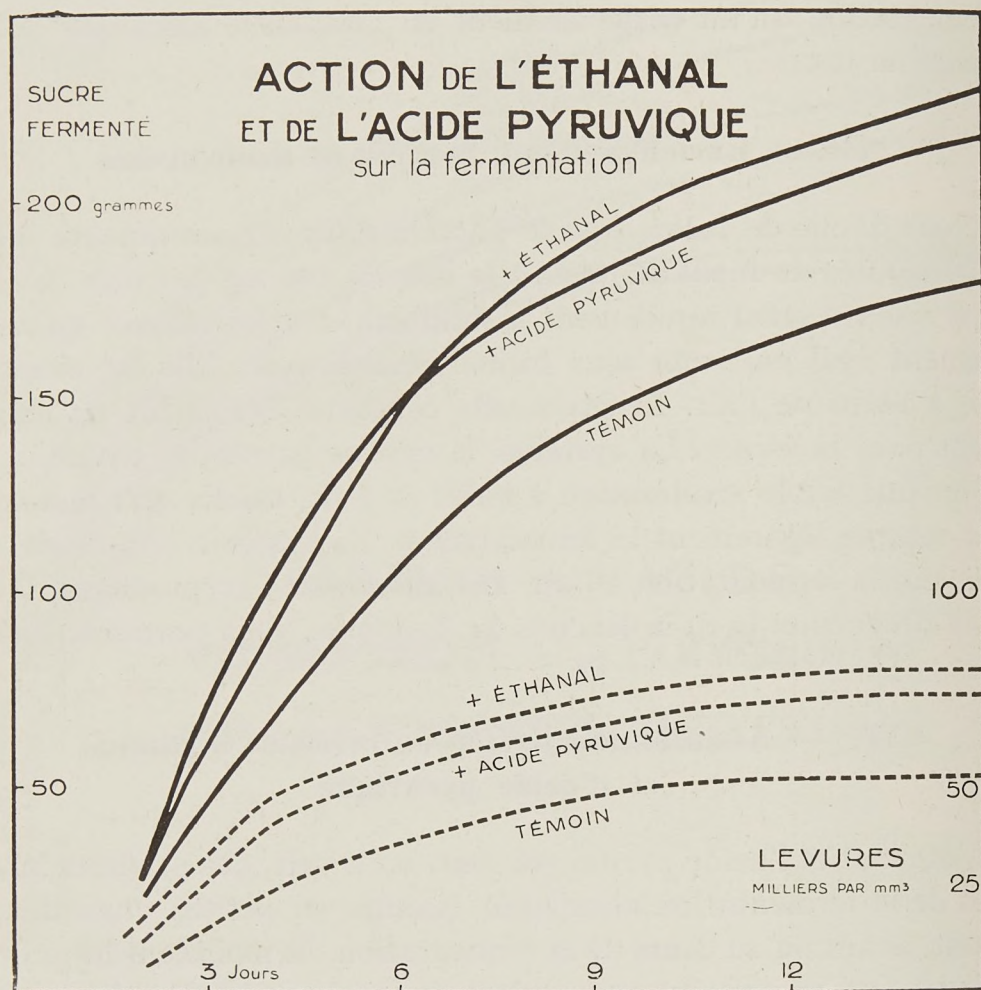


FIG. 4

mentation, les tirets la croissance des levures. Les graphiques 5, 6, 7 et 8, qui comparent ces produits à divers activateurs vitaminiques, sont encore des exemples des mêmes phénomènes. Ces deux corps possèdent un effet activateur très net. A l'abri de l'air, l'avance par rapport au témoin se chiffre tout au long de la fermentation par 20 à 30 g de sucre transformé. Après quinze jours d'incubation, le nombre des levures est augmenté de 18 p. 100 en présence d'éthanal et de 25 p. 100 en présence d'acide pyruvique. A l'air, où la vitesse de la fermentation est déjà plus grande, l'activation est moindre, mais reste sensible.

Du tableau II qui expose les résultats des diverses analyses, nous pouvons tirer les remarques suivantes :

1^o La présence d'éthanal et d'acide pyruvique augmente le nombre des levures, tandis que le poids total des cellules formées ne varie pratiquement pas. Une addition de sel ammoniacal par contre, non seulement favorise la croissance des levures, mais augmente leur poids sec final de 43 p. 100 à l'abri de l'air, et de 50 p. 100 à l'air.

2^o Dans un milieu riche en azote ammoniacal, le taux d'azote fixé par les levures est considérablement augmenté lorsqu'on introduit de l'éthanal ou de l'acide pyruvique : respectivement de 45 p. 100 à l'air et de 55 p. 100 à l'abri de l'air. L'apport supplémentaire d'azote ammoniacal à lui seul ne peut modifier ce taux. En somme, dans les conditions normales, les levures ne prélèvent pas davantage d'azote au milieu, lorsqu'on leur offre un excédent d'azote ammoniacal. Cet apport d'azote ammoniacal économise donc, pour ainsi dire, l'azote organique du moût.

TABLEAU II

Influence de l'éthanal et de l'acide pyruvique sur l'assimilation azotée

Moût de raisin : Sucre 210 g — N total 253 mg — NH_4 22 mg. Fermentation en semi-aérobiose.

	Nombre de levures en milliers par mm ³	Poids sec des levures g par l	N prélevé par les levures mg par l	N % du poids sec	NH_4 restant mg par l
Sans enrichissement en azote ammoniacal					
Témoin.....	67	1,72	141	8,2	1,7
+ Éthanal.....	101	1,73	158	9,6	2,1
+ Acide pyruvique...	102	1,73	158	9,6	2,1
Avec addition de 150 mg d'azote ammoniacal					
Témoin.....	84	2,68	158	5,9	2,8
+ Éthanal.....	126	2,81	231	8,2	3,5
+ Acide pyruvique...	124	2,90	245	8,4	3,1

3^o La concentration en azote ammoniacal restant dans les milieux fermentés est toujours très faible. Si donc en présence d'un excès d'éthanal et d'acide pyruvique, la quantité d'azote prélevée dans le moût est fortement augmentée, c'est que ces deux corps permettent l'assimilation de certaines substances azotées qui ne seraient pas utilisées par la levure en leur absence.

L'éthanal et l'acide pyruvique jouent le rôle d'activeurs de la fermentation en diminuant la période de latence. Ce fait avait été signalé par FLANZY et BANOS pour l'éthanal en 1938 (19). En présence de quantités

suffisantes d'azote ammoniacal, ces corps favorisent la protéosynthèse et la croissance des levures.

Ceci est en accord avec les conceptions de EFFRONT, de BERNHAUER et de FINK, exposées par VAN LAER (20), qui voient dans l'éthanal le point de départ de la protéosynthèse. Toutefois, l'augmentation du nombre des cellules ne s'accompagne pas d'une augmentation du poids de matière vivante. Tout se passe comme si, contrairement à un apport d'azote ammoniacal qui permet l'accumulation des réserves se traduisant par un accroissement du poids de levures formées, l'éthanal et l'acide pyruvique facilitaient la multiplication cellulaire aux dépens des réserves non azotées.

Dans un autre ordre d'idée, signalons encore que l'addition à un moût de 0,5 à 1 g d'acides nucléique ou désoxyribonucléique active nettement la fermentation.

V. — Conclusions

Bien que le moût de raisin soit un milieu assez riche en substances azotées, un apport supplémentaire d'azote ammoniacal stimule habituellement la fermentation et augmente sensiblement la croissance levurienne. La fixation par les levures de l'azote ammoniacal est étroitement liée à l'importance de l'aération du milieu. Elle est beaucoup plus forte en présence d'oxygène. En outre l'assimilation azotée paraît être sous la dépendance de la présence d'éthanal et d'acide pyruvique, produits intermédiaires de la fermentation alcoolique et qui sont vraisemblablement aussi, les produits intermédiaires de la protéosynthèse. L'importance de l'effet activant produit par ces substances dépend essentiellement de la concentration initiale du milieu en azote. Le plus souvent cependant, l'activation due à l'addition des sels ammoniacaux est inférieure à celle que provoquent dans le même milieu, les activateurs vitaminiques ou d'origine fongique qui sont étudiés plus loin.

CHAPITRE IV

FACTEURS DE CROISSANCE DES LEVURES

La connaissance des besoins en facteurs de croissance des levures concerne à la fois la biochimie et la microbiologie et trouve une application immédiate dans les industries de fermentation. Ceci explique l'intérêt qu'elle a suscité depuis longtemps. On distingue des levures « auxo-autotrophes », qui peuvent se développer et provoquer la fermentation en milieu strictement privé de facteurs de croissance, car on suppose qu'elles sont capables de les synthétiser, et des levures « auxo-hétérotrophes »,

incapables de se multiplier s'il manque quelque facteur de croissance dans la solution nutritive.

LIEBIG en 1871 (21) observe le premier que certaines levures ne se développent en milieu synthétique que si l'on ajoute à ce dernier une sorte de stimulant, qui peut être un extrait aqueux stérile de levures. Mais c'est à WILDIERS (22), que l'on doit la découverte de ces substances indispensables à la croissance des levures et qu'il dénomme « bios ». Les travaux d'EASTCOTT (23) sur le mésoinositol marquent le commencement des découvertes relatives à la nature chimique des facteurs de croissance. WILLIAMS et ROEHM (24) ont étudié ensuite l'action de la thiamine ; KÖGL et TÖNNIS (25) celle de la biotine. En 1933 WILLIAMS (26) met en évidence le rôle stimulant de l'acide pantothénique et sept ans après seulement, il parvient à en élucider la composition chimique (27). SCHULTZ, ATKIN et FREY (28) d'une part, EAKIN et WILLIAMS (29) d'autre part devaient en 1939 découvrir la pyridoxine.

On sait maintenant que le « bios » est un mélange de substances universellement répandues dans les règnes animal et végétal et dont cinq constituent des vitamines importantes : la thiamine, la pyridoxine, l'acide pantothénique, la biotine et le mésoinositol. Deux autres corps, l'acide nicotinique (ROGOSA, 30) et l'acide p-aminobenzoïque (RAINBOW, 31, CUTTS et RAINBOW, 32) influent aussi sur la croissance de certaines levures. Enfin, récemment TRIA et BARNABEI (33) ont obtenu la purification partielle d'une substance dont la présence dans les extraits de foie autolysé avait été signalée par ALEXANDER et SUBBAROW (34) et qui, résistante aux agents chimiques, dialysable, adsorbable sur charbon activé, soluble dans l'eau, active croissance et fermentation des levures du type *Saccharomyces cerevisiae*.

L'interaction des cinq constituants du bios sur la croissance des levures a été étudiée tout d'abord par WILLIAMS, EAKIN et SNELL (35) expérimentant avec trois souches de *Saccharomyces cerevisiae* cultivées en milieu synthétique, à la température de 30°C. Des mesures de trouble effectuées après 72 heures d'incubation montrent que l'inositol, la thiamine et la biotine favorisent légèrement la croissance, que la pyridoxine est sans effet ; par contre, aucun développement n'est possible pendant les premières 24 heures en l'absence de biotine. Toutefois, d'après les auteurs, si l'on prolonge le temps d'incubation, biotine et acide pantothénique deviennent interchangeable, et de plus, les levures peuvent croître, quoique faiblement, dans un milieu dépourvu des cinq facteurs.

LEONIAN et LILLY (36) ont estimé, par pesées des cellules formées, l'influence des cinq vitamines sur 10 souches de *Saccharomyces cerevisiae*, après 72 heures d'incubation à 25°C : une seule exige la thiamine, quatre l'inositol. Les dix levures ont une croissance très diminuée en l'absence d'acide pantothénique et inexistante en l'absence de biotine.

Ces auteurs notent aussi que, après un temps prolongé d'incubation, les levures finissent par se multiplier même dans un milieu totalement privé de vitamines. Ils attribuent cette possibilité de croissance soit à une lente synthèse des vitamines manquantes, soit à un développement des levures à tendance autotrophe permettant la croissance ultérieure des cellules hétérotrophes.

Des essais de classification des levures d'après leurs besoins en facteurs de croissance ont été entrepris par de nombreux auteurs. SCHULTZ, ATKIN et FREY (37) ont proposé de répartir les *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces carlsbergensis* en trois groupes d'après leurs besoins en thiamine et thiamine-pyridoxine, dans un milieu contenant déjà les trois autres facteurs. Plus tard (38), ces mêmes auteurs ont préconisé la caractérisation de chaque levure par son « bios number », obtenu en juxtaposant les numéros donnés aux divers facteurs de croissance nécessaires ; ce chiffre définirait ainsi les besoins auxologiques d'une levure. LOCHHEAD et LANDERKIN (39) ont classé 33 souches de 18 espèces de *Zygosaccharomyces* osmophiles d'après leurs besoins en acide pantothénique. BURKHOLDER en 1943 (40) étudiant les besoins vitaminiques de 38 levures appartenant à des espèces très différentes, signale que 15 de celles-ci exigent la thiamine, 14 l'acide pantothénique, 6 l'acide nicotinique, 4 le mésoinositol, 4 la pyridoxine et 36 la biotine. Un *Saccharomyces oviformis* est en outre retenu pour son besoin en pyridoxine en vue de son utilisation éventuelle au dosage microbiologique de ce facteur. En 1948 (41), l'auteur publiait des travaux du même ordre portant sur 110 espèces différentes de levures : la nécessité de la biotine se retrouve dans 87 p. 100 des cas, celle de la thiamine et de l'acide pantothénique dans 35 p. 100, celle de la pyridoxine, de l'acide nicotinique et du mésoinositol dans 12 p. 100 des cas environ. Une levure du type *Kloeckera brevis* pourrait servir au dosage du mésoinositol.

ATKIN et GRAY (42) ont tenté une classification des levures de brasserie en montrant l'importance de l'inositol pour ces levures et l'équivalence de la thiamine et de la pyridoxine pour certaines d'entre elles. Cette dernière observation avait déjà été faite par SCHULTZ pour les levures de boulangerie et, tout récemment, MOSES et JOSLYN ont précisé les conditions de ce phénomène (43). Par contre, la thiamine inhibe la croissance de *Saccharomyces carlsbergensis* utilisée pour le dosage de la pyridoxine, en l'absence de ce dernier facteur, d'après RABINOWITZ et SNELL (44).

SCHOPPER (45) s'est surtout attaché à différencier les levures du genre *Candida*, dont il a fait 4 groupes. MENZINSKY (46) a noté le comportement d'un *Saccharomyces cerevisiae* dont la croissance aérobie est favorisée par la thiamine, l'inositol et la biotine.

Enfin, tout récemment, WHITE et MUNNS (47) ont donné une méthode de détermination qualitative et quantitative des vitamines nécessaires

aux levures, au moyen de levures de bière sélectionnées, réagissant en particulier à la biotine, l'inositol et l'acide pantothénique.

Les besoins en facteurs de croissance des levures de vin ont été étudiés par VERONA (48) en Italie et WIKEN (49) en Suisse. Ces deux auteurs concluent de manière sensiblement différente. Le premier opère à la température de 24°C, en milieu solide et note, après une période d'incubation de 8 jours, les exigences en mésoinositol, acide pantothénique et pyridoxine des *Kloeckera apiculata*, la sensibilité à la pyridoxine de *Torula-spora rosei*, l'autotrophie de *Candida pulcherrima*, et en outre, un développement imperceptible de *Saccharomyces ellipsoïdeus* sur milieu non vitaminé. Le travail de WIKEN porte sur trois levures sélectionnées ayant un fort pouvoir alcoogène, utilisées dans la vinification en blanc. Cultivées dans un milieu simple contenant seulement glucose, sels minéraux, sulfate d'ammonium et caséine hydrolysée exempte de vitamines comme source d'azote, ces levures, après un temps d'incubation variant de 24 à 144 heures, se montrent absolument auxo-autotrophes, continuant à se développer en milieu dépourvu de vitamines après 120 repiquages au cours des 8 mois pendant lesquels s'est poursuivie l'expérimentation. En conclusion, l'auteur met en garde contre une généralisation trop étendue de l'auxo-hétérotrophie des levures cultivées, opposée à l'auxo-autotrophie des levures sauvages.

En résumé, les besoins en facteurs de croissance des levures de bière et de boulangerie ont été déterminés dans des milieux entièrement synthétiques de composition variable, à température assez élevée, soit 30°C, et à pH 5. L'estimation de la croissance est réalisée par pesées de la masse de levures formées ou, le plus souvent, par mesure néphélométriques après un temps d'incubation relativement court, qui ne dépasse pas 72 heures. Les travaux consacrés aux besoins vitaminiques des levures de vin sont plus rares ; les auteurs qui s'y sont attachés ont senti la nécessité de prolonger le temps d'observation, qui varie alors de 6 à 8 jours.

I. — Besoins en facteurs de croissance des levures de vin cultivées en milieu synthétique

Notre étude des besoins en facteurs de croissance des levures du Médoc et de Saint-Émilion se propose un but à la fois pratique et théorique : d'une part, connaître les besoins réels de telles levures ; d'autre part, apporter des informations complémentaires susceptibles d'aider à une classification générale des levures du Bordelais entreprise par ailleurs (50) ; enfin, rechercher des souches de levures dont la réponse à un facteur bien déterminé est suffisamment nette pour que cette levure soit utilisable au dosage de ce facteur.

Il était indispensable d'étudier l'influence de chaque facteur, non seulement sur la croissance, mais aussi, sur la fermentation des levures.

Les essais ont été conduits avec un milieu de culture et selon un mode opératoire différents de ceux des auteurs précédents. On s'est rapproché des conditions de travail des levures de vin dans la pratique, et leur comportement a été suivi par trois techniques différentes.

Milieu de culture. — Il ne contient que des produits cristallisés. On a remplacé les additions de traces de métaux et de sels minéraux par l'emploi de cendres de levures. La composition du milieu est la suivante pour 1 litre :

Saccharose (ou glucose)	100 g
Phosphate monopotassique	2 g
Sulfate d'ammonium	1 g
Asparagine.....	2 g
Acide citrique	6 g
Cendres de 300 g de levure pressée de boulangerie.	

La solution est ajustée à pH 3,5 par addition de potasse.

Mode opératoire. — Dans ce milieu de base, les facteurs de croissance sont introduits aux doses suivantes : 0,2 mg par litre pour la thiamine, la pyridoxine, l'acide nicotinique, l'acide pantothénique et l'acide p-aminobenzoïque ; 20 γ pour la biotine et 10 mg pour le mésoinositol.

On opère en tubes à essai calibrés. A 10 cm³ du milieu de base stérilisé, on ajoute les vitamines en solution stérile, de façon à ce que chaque tube reçoive tous les facteurs de croissance, sauf un. Un tube ne reçoit aucun facteur de croissance, un autre tube les reçoit tous. Chaque série comporte donc 9 tubes et chaque essai est réalisé en double. On commence avec une goutte calibrée d'un levain préparé en diluant au centième dans l'eau stérile, du moût de raisin fermentant depuis 2 jours avec la levure à étudier. La population de départ est de 1 à 2 levures par mm³.

Les tubes à essai sont obturés par un bouchon de caoutchouc traversé par un tube de verre rempli de coton et terminé extérieurement par une effilure très fine. Ce système d'obturation permet un dégagement facile du gaz carbonique et réduit au minimum l'évaporation du liquide. Les fermentations se poursuivent dans ces conditions, en semi-anaérobiose. Les tubes sont placés à l'étuve à 25°C.

Le comportement des levures est suivi de trois façons : 1° Dans les premières heures, on évalue la croissance par des mesures néphélométriques à l'électrophotomètre effectuées directement sur les tubes après agitation ; les troubles sont exprimés en pourcentage de lumière transmise. 2° La marche de la fermentation est suivie par pesées des tubes à intervalles réguliers, tous les deux jours par exemple. On corrige la perte de poids de celle, toujours faible, d'un tube d'eau distillée obturé de la même façon ; on poursuit les pesées jusqu'à la fin de la fermentation pour

en fixer la limite. 3° On procède alors à une numération des levures au compte-globules de Malassez ; ce chiffre renseigne sur la croissance totale.

Ces trois mesures sont nécessaires et les seules mesures néphélométriques du début, utilisées jusqu'ici par les auteurs, donnent des renseignements incomplets et parfois une idée fausse de ce que sera la multiplication cellulaire totale. Ainsi pour la plupart des *Saccharomyces*, on pourrait conclure des lectures à l'absorptiomètre effectuées dans les premières heures, que la biotine ne joue aucun rôle sur la croissance. Les numérations finales montrent au contraire que, sans biotine, la multiplication des levures reste très incomplète. De même, croissance et vitesse de fermentation ne sont pas obligatoirement des phénomènes parallèles ; l'absence de biotine qui diminue jusqu'à trois fois la croissance totale, est absolument sans effet sur la vitesse et la limite de la fermentation.

Notre travail a porté au total sur 54 souches de levures appartenant à 8 espèces différentes, soit 40 levures du Bordelais isolées et caractérisées dans nos laboratoires, et 14 levures provenant de collections étrangères (Centraalbureau voor Schimmelcultures de Delft et Institut microbiologique de Pérouse). Nous exposerons successivement, pour chaque genre et espèce, les vitamines nécessaires à la croissance et à la fermentation. Les tableaux III, IV, V et VI donnent des exemples des résultats obtenus.

Saccharomyces ellipsoideus. Ces levures sont parfaitement capables de se multiplier dans un milieu absolument privé de vitamines, et il est possible d'entretenir des souches dans un tel milieu par des repiquages successifs. Ces levures sont donc auxoautotrophes. Cependant elles sont plus ou moins fortement affectées dans leur croissance par l'absence d'acide pantothénique, de biotine et de mésoinositol, et dans leur fermentation par l'absence d'acide pantothénique surtout, et de thiamine à un degré moindre (tableau III). Le manque d'acide pantothénique retarde de 4 à 6 jours le départ de la fermentation ; le retard est de 5 à 7 jours en l'absence totale de vitamines. Mais dans les deux cas, la fermentation, dès qu'elle est déclarée, se poursuit à une vitesse normale jusqu'à complète transformation du sucre. En fin de fermentation, dans le milieu dépourvu de vitamines, le nombre des levures reste très faible. Suivant les souches, il représente de la moitié au dixième de la population obtenue en présence des 7 vitamines.

Les *Saccharomyces* appartenant aux espèces *steineri*, *chevalieri*, *bayanus*, *oviformis*, *carlsbergensis*, sont également autotrophes et les mêmes vitamines activent leur croissance et leur fermentation. *Saccharomyces italicus* est assez sensible à la carence en acide nicotinique, et *Saccharomyces fructuum*, est gêné par le manque de pyridoxine et d'acide pantothénique.

Enfin *Saccharomyces uvarum* (tableau III), également autotrophe, voit sa croissance influencée par l'absence d'acide pantothénique, de

TABEAU III

Besoins en facteurs de croissance de quelques *Saccharomyces*

L'intensité des troubles est évaluée en pourcentage de lumière transmise.

Le nombre de levures est exprimé en milliers par mm³ à la fin de la fermentation

	<i>Sacch. ellipsoideus</i> 29						<i>Sacch. uvarum</i> 10						<i>Sacch. italicus</i> 125					
	Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg		
	Trouble	Nbre de levures		3 jours	4 jours	7 jours	Trouble	Nbre de levures		3 jours	5 jours	8 jours	Trouble	Nbre de levures		4 jours	7 jours	9 jours
Sans vitamine.....	70	6		24	47	136	98	4		13	55	108	100	20		5	58	122
Avec toutes les vitamines.....	6	58		309	423	468	25	110		316	439	462	24	76		350	452	465
Sans biotine.....	6	19		230	360	465	25	75		235	401	454	14	45		322	445	460
Sans pyridoxine.....	6	48		316	446	468	20	109		343	451	464	29	58		198	425	461
Sans thiamine.....	20	41		161	378	465	52	77		193	437	465	62	60		108	421	460
Sans pyridoxine-thiamine.....	24	46		181	361	464	50	88		202	434	477	66	62		118	412	446
Sans ac. pantothénique.....	50	15		69	175	400	31	52		189	396	460	100	40		5	192	312
Sans mésoinositol.....	20	29		196	252	460	95	56		17	205	450	51	46		188	427	451
Sans ac. nicotinique.....	8	54		323	440	464	25	88		307	445	462	31	38		96	306	363
Sans P.A.B. (1).....	8	54		355	451	460	25	100		295	426	465	22	66		281	446	460

(1) Acide p. aminobenzoïque.

TABEAU IV

Besoins en facteurs de croissance des *Kloeckera* et *Hanseniaspora*

L'intensité des troubles est évaluée en pourcentage de lumière transmise.

Le nombre de levures est exprimé en milliers par mm³ à la fin de la fermentation

	<i>Kloeckera apiculata</i> 4						<i>Hanseniaspora apulensis</i> 106						<i>Kloeckera magna</i> 102					
	Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg		
	Trouble	Nbre de levures		7 jours	10 jours	15 jours	Trouble	Nbre de levures		6 jours	11 jours	18 jours	Trouble	Nbre de levures		5 jours	7 jours	12 jours
Sans vitamine.....	100	0	0	0	0	0	98	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
Avec toutes les vitamines	44	17	184	240	315	28	28	44	276	406	464	464	41	50	221	245	460	460
Sans biotine	46	17	123	165	241	43	43	41	276	383	464	464	51	17	159	209	454	454
Sans pyridoxine	68	9	118	174	256	75	75	5	82	204	266	266	64	22	30	71	254	254
Sans thiamine.....	74	4	46	59	88	83	83	5	20	37	61	61	90	5	10	19	36	36
Sans thiamine-pyridoxine.....	80	4	30	69	138	90	90	5	47	76	96	96	91	43	14	54	306	306
Sans ac. pantothénique	100	0	0	0	0	98	98	2	35	73	95	95	100	30	9	145	422	422
Sans mésoinositol.....	100	0	0	0	0	95	95	0,1	13	15	31	31	100	20	9	149	438	438
Sans ac. nicotinique	90	0,1	34	43	60	86	86	2	34	57	87	87	100	43	25	232	449	449
Sans P.A.B. (1).....	50	9	143	185	238	28	28	33	267	382	460	460	48	46	154	246	441	441

(1) Acide p. aminobenzoïque.

(1) Acide p. aminobenzoïque.

TABEAU V
Besoins en facteurs de croissance des *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis*

L'intensité des troubles est évaluée en pourcentage de lumière transmise.
Le nombre de levures est exprimé en milliers par mm³ à la fin de la fermentation

	<i>Pichia fermentans</i> 20						<i>Hansenula anomala</i> 29						<i>Torulopsis stellata</i> 39					
	Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures			Fermentation. Perte de poids en mg		
	Nbre de levures			6 jours			Nbre de levures			5 jours			Nbre de levures			5 jours		
	Trouble						Trouble						Trouble					
Sans vitamine.....	22	48	209	271	395		28	70	78	92	214		24	26	56	60	83	
Avec toutes les vitamines.....	15	73	230	324	460		36	150	117	258	352		8	44	109	188	339	
Sans biotine.....	20	53	212	286	433		32	103	92	175	246		12	32	53	65	87	
Sans pyridoxine.....	15	70	171	243	360		30	116	69	140	236		10	38	51	61	84	
Sans thiamine.....	20	64	129	219	344		22	101	63	109	176		14	35	96	109	141	
Sans thiamine-pyridoxine.....	16	64	152	230	359		20	103	71	153	285		10	38	65	71	95	
Sans ac. pantothenique.....	15	39	194	263	418		20	118	121	247	434		24	39	42	49	65	
Sans inositol.....	17	79	189	286	443		20	93	97	180	318		10	39	87	93	118	
Sans ac. nicotinique.....	20	66	147	217	357		30	103	68	131	246		8	28	61	71	98	
Sans P.A.B. ⁽¹⁾	19	76	219	332	460		30	110	97	198	388		8	29	50	62	77	

⁽¹⁾ Acide p. aminobenzoïque.

TABEAU VI

Besoins en facteurs de croissance des *Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Candida*

L'intensité des troubles est évaluée en pourcentage de lumière transmise.
Le nombre de levures est exprimé en milliers par mm³ à la fin de la fermentation

	<i>Saccharomyces ludwigii</i> 100					<i>Torulaspora rosei</i> 101					<i>Candida pulcherrima</i> 33				
	Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg			Croissance des levures		Fermentation. Perte de poids en mg		
	Trouble	Nbre de levures	5 jours	8 jours	13 jours	Trouble	Nbre de levures	5 jours	7 jours	12 jours	Trouble	Nbre de levures	5 jours	7 jours	15 jours
Sans vitamine.....	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	73	20	45	82	162
Avec toutes les vitamines.....	32	23	223	369	460	24	65	148	261	465	80	138	146	246	439
Sans biotine.....	32	15	185	301	416	31	29	146	245	446	73	25	58	83	222
Sans pyridoxine.....	70	8	35	93	264	58	13	35	76	175	70	102	141	225	435
Sans thiamine.....	81	15	72	166	331	69	21	67	167	346	70	100	120	245	463
Sans thiamine-pyridoxine.....	98	0,3	16	19	24	94	4	16	20	31	70	83	135	252	444
Sans ac. pantothénique.....	1 000	15	19	38	203	41	41	143	278	450	68	110	125	214	455
Sans mésoinositol.....	39	11	186	298	430	37	43	133	264	446	68	90	132	225	417
Sans ac. nicotinique.....	96	1	19	26	35	54	49	158	267	462	83	86	132	290	458
Sans P.A.B. (1).....	30	13	258	383	467	24	52	144	235	462	74	93	150	239	460

(1) Acide p. aminobenzoïque.

(1) Acide p. aminobenzoïque.

mésoinositol et de biotine ; la fermentation est retardée surtout en l'absence de mésoinositol (retard identique à celui apporté par le manque complet de vitamines) et, à un degré moindre, d'acide pantothénique et de thiamine.

Kloeckera apiculata (tableau IV). Ces levures sont incapables de se multiplier et de fermenter dans un milieu dépourvu de vitamines, ou en l'absence de mésoinositol. Elles sont auxohétérotrophes. Leurs exigences vis-à-vis de l'acide pantothénique, de l'acide nicotinique et de la thiamine sont plus ou moins marquées. L'absence des deux premiers facteurs peut rendre impossible tout développement levurien. La biotine et l'acide p-aminobenzoïque activent très légèrement leur croissance, mais n'ont aucun effet sur leur fermentation.

Kloeckera magna (tableau IV). Cette souche, également hétérotrophe, se singularise par son exigence en thiamine. Dans un milieu dépourvu de ce facteur, la croissance est le dixième de celle qu'on observe en milieu contenant les 7 vitamines et la fermentation est pratiquement nulle. Elle est de plus, influencée dans sa croissance, mais plus faiblement, par l'acide pantothénique, la biotine et la pyridoxine. Ces derniers facteurs de croissance activent sa fermentation. Par contre la biotine et l'acide p-aminobenzoïque sont sans effet.

Kloeckeraspora osmophila. Cette souche a donné, dans un milieu dépourvu de vitamines, un développement faible (500 levures par mm³) et la fermentation a porté au total sur une trentaine de grammes de sucre. Elle est cependant capable de se passer de vitamines. Tous les facteurs agissent sur sa croissance et sa fermentation à des degrés divers. Elle s'écarte assez nettement des levures du genre *Kloeckera*. Par contre une levure apiculée sporogène du genre *Hanseniaspora* (tableau IV) est hétérotrophe et ses besoins vitaminiques sont identiques à ceux des *Kloeckeras*.

Pichia fermentans fermente très lentement le sucre (tableau V) et présente des besoins très faibles. En l'absence complète de vitamines, elle reste capable de transformer la totalité du sucre du milieu.

Le caractère d'autotrophie de *Pichia membranaefaciens* est moins marqué. L'absence totale de vitamines diminue de moitié la croissance et ne permet qu'une fermentation très incomplète du sucre. Ces levures sont particulièrement sensibles à la biotine en ce qui concerne leur croissance et à la thiamine en ce qui concerne leur fermentation.

Zygosaccharomyces florentinus s'est montré affecté dans sa croissance par le manque de biotine, d'acide nicotinique et de mésoinositol, et dans sa fermentation par la carence en acide pantothénique et en mésoinositol.

Saccharomycodes ludwigii (tableau VI), outre son hétérotrophie, se caractérise par ses besoins simultanés en thiamine et pyridoxine. Tandis que l'absence de l'un ou de l'autre facteur n'affecte que très légèrement

sa croissance, le couple est absolument indispensable à son développement et à sa fermentation. Thiamine et pyridoxine sont donc interchangeables pour cette levure. Par ailleurs, l'acide nicotinique, la pyridoxine et l'acide pantothénique activent légèrement sa fermentation.

Saccharomyces bisporus est également auxohétérotrophe. Tous les facteurs sont nécessaires à une croissance optimum, mais la biotine et le mésoinositol sont de tous les plus actifs. On retrouve l'influence marquée du couple pyridoxine-thiamine. L'acide pantothénique est nécessaire à une bonne fermentation ; son absence prolonge de 10 jours environ la phase de latence.

Torulaspora rosei est auxohétérotrophe (tableau VI). Alors que cette levure se multiplie en l'absence de thiamine ou de pyridoxine, elle ne peut plus se développer lorsque ces deux facteurs de croissance viennent à manquer simultanément. Le mésoinositol et la biotine aussi sont nécessaires, mais à un degré moindre.

Torulaspora delbruckii par contre est autotrophe. Sa croissance est surtout retardée par l'absence de mésoinositol, de pyridoxine et d'acide pantothénique, sa fermentation par le manque de mésoinositol, dont l'absence empêche la complète transformation du sucre. L'influence du groupe pyridoxine-thiamine montrant que la levure est capable d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre de ces vitamines, est assez marquée.

Torulopsis bacillaris est dans le genre *Torulopsis* la seule levure hétérotrophe que nous ayons rencontrée. Le mésoinositol est en effet pour elle un facteur indispensable, tandis que la biotine et l'acide pantothénique activent seulement sa croissance, et le groupe pyridoxine-thiamine sa fermentation.

Torulopsis stellata est par contre auxoautotrophe (tableau V). Ses besoins varient selon les souches. Pour deux d'entre elles, l'acide *p*-aminobenzoïque est le facteur le plus influant, et ce sont les seules levures que nous ayons trouvées possédant ce caractère.

Torulopsis famata est de même nettement auxoautotrophe et sa croissance est activée par la thiamine, la pyridoxine et la biotine. Ces mêmes facteurs, le mésoinositol et l'acide nicotinique activent sa fermentation.

Pour *Torulopsis utilis* enfin, si aucun n'est absolument indispensable, tous les facteurs lui sont utiles et en particulier le mésoinositol, l'acide pantothénique et la thiamine.

Candida pulcherrima est une levure autotrophe (tableau VI) dont la croissance cependant est plus ou moins activée par tous les facteurs, et dont la fermentation est plus rapide en présence de biotine.

En résumé, à l'exception des levures de l'espèce *Torulopsis* qui sont relativement hétérogènes dans leurs exigences vitaminiques, toutes les souches de levures étudiées se comportent à quelques légères variantes

près, d'une manière très comparable dans le cadre d'une même espèce.

D'une manière générale :

— Les *Saccharomyces* sont auxoautotrophes, mais certaines vitamines, et en premier lieu l'acide pantothénique, activent fortement leur croissance.

— Les *Kloeckeras* sont hétérotrophes et l'absence de mésoinositol interdit tout développement.

— Les *Pichias* et les *Hansenulas* n'ont pratiquement aucun besoin en facteurs de croissance.

— Les *Saccharomycodes* ne peuvent se développer s'il manque au milieu de culture à la fois la thiamine et la pyridoxine.

— Les *Torulasporas* sont sensibles à l'absence du groupe pyridoxine-thiamine et, de plus, au mésoinositol. L'auxoautotrophie n'est pas générale dans ce genre.

Les *Candidas* sont auxoautotrophes ; la biotine active leur fermentation.

Il semble que le caractère de chaque espèce soit assez constant pour aider à la classification des levures.

En outre, le dosage de certaines vitamines peut être envisagé au moyen de quelques levures étudiées, présentant des exigences très accusées pour un facteur de croissance. C'est ainsi que le dosage de l'acide pantothénique est possible avec une quelconque des levures de l'espèce *Saccharomyces ellipsoïdeus* ou *Zygosaccharomyces bisporus*. Les dosages du mésoinositol et de l'acide nicotinique s'effectueront avec des *Kloeckera apiculatas* ; *Kloeckera magna* pourrait trouver son utilisation dans le dosage de la thiamine ; *Saccharomyces fructuum* dans celui de la pyridoxine. WHITE et MUNNS (47) ont basé de la même manière des techniques de dosage microbiologique des vitamines sur la « réponse » de certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

L'application à certaines espèces de levures, en particulier aux *Saccharomyces cerevisiae*, du qualificatif d'auxoautotrophes, nous met en contradiction avec certains auteurs qui estimaient les besoins en facteurs de croissance des levures après une période très courte d'incubation. Cependant, plusieurs auteurs ont signalé que, si on leur en donne le temps, les *Saccharomyces* se développent fort bien en l'absence totale de vitamines. Nos observations concordent de même parfaitement avec celles de WIKEN à ce sujet.

II. — Influence de l'enrichissement du moût de raisin en facteurs de croissance

Les besoins en facteurs de croissance des levures de vin étant déterminés, il nous reste à connaître quelle est la richesse moyenne du moût

de raisin en ces différents facteurs et quelle accélération de la fermentation on peut obtenir par un enrichissement des moûts.

Nous ne possédons que peu de données précises sur la composition vitaminique du jus de raisin. La concentration en thiamine a fait l'objet de plusieurs études (GENEVOIS, 51) ; elle est de 0,2 à 0,5 mg par litre. PERLMAN et MORGAN (52) chiffrent de 0,6 à 1,98 mg la teneur en pyridoxine et de 0,9 à 1,5 mg celle en acide pantothénique. Récemment CASTOR (53) a déterminé par des méthodes microbiologiques, les variations des divers facteurs de croissance au cours de la fermentation d'un moût de raisin. D'après cet auteur, les taux d'acide pantothénique, de pyridoxine, de biotine et d'acide nicotinique diminuent au cours de la fermentation ; l'acide *p*-aminobenzoïque diminue également, mais revient à son taux initial en fin de fermentation ; le mésoinositol existe en très grande quantité dans le raisin et les besoins des levures en ce facteur sont si faibles que le taux de mésoinositol n'est pas modifié par la fermentation.

Enfin à la Station de Recherches de Wädenswill, dans une étude de la fermentation des jus de pommes et de poires, il a été montré que l'addition de 0,5 mg de thiamine et de 10 gammas de biotine active autant la fermentation que 200 mg de sulfate d'ammoniaque (54).

Nous avons essayé de déterminer l'effet d'une addition des divers facteurs de croissance, ajoutés individuellement ou en groupe, dans de nombreux moûts de raisins blancs et rouges, de provenances diverses, prélevés au cours des récoltes des trois dernières années, et fermentant soit avec les levures du cru, soit, après élimination de ces dernières, par filtration, avec une race pure de levures.

a) **Efficacité de la thiamine.** — L'addition de pyridoxine, d'acide pantothénique, d'acide nicotinique, seuls ou associés, sont sans effet sur la fermentation du moût de raisin. On peut donc penser que le moût en contient toujours suffisamment. Par contre, la biotine, le mésoinositol et surtout la thiamine agissent presque toujours de manière favorable, mais avec une intensité très variable suivant le moût expérimenté et en particulier, l'année de la récolte. La vitamine B₁ est, de tous les facteurs de croissance, le plus efficace. Son emploi a été préconisé en vinification par J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD (55).

Voici un des essais types effectué avec un moût de raisin titrant 172 g de sucre par litre, provenant de la récolte 1951. Les levures du cru sont éliminées par centrifugation et filtration. Onensemence avec quelques gouttes d'un levain frais de la levure n° 51, dont les besoins en facteurs de croissance sont connus : la biotine est utile à sa croissance, l'acide pantothénique à sa fermentation. On laisse fermenter à l'air à la température de 25°C, après avoir fait au moût l'une des additions suivantes,

par litre : 25 γ de biotine, 10 mg de mésoinositol, 0,5 mg de thiamine, et des trois facteurs simultanément à ces mêmes doses. Le tableau VII reproduit les résultats obtenus. La biotine et le mésoinositol montrent sensiblement le même pouvoir activateur. Mais la présence de thiamine confère à la fermentation une avance d'une vingtaine de grammes de sucre par rapport à celle qui s'obtient en présence de biotine et de mésoinositol, et d'une quarantaine de grammes par rapport à la fermentation témoin. Cette avance se poursuit tout au long du phénomène. Au troisième jour, le nombre de levures est accru de 43 p. 100. Les trois vitamines associées n'agissent pas plus fortement que B₁, et il est clair que toute l'impulsion donnée à la fermentation par ce groupe revient à cette dernière.

Depuis les premières expériences effectuées à la Station œnologique de Bordeaux, de nombreux auteurs ont repris cette étude. CASAS en Espagne (55 bis), mais surtout GARINO-CANINA en Italie (56), confirment l'efficacité de la thiamine, qu'ils considèrent égale ou supérieure à celle d'un sel ammoniacal. J. RIBÉREAU-GAYON et P. RIBÉREAU-GAYON (57) ont noté en 1952, dans la vinification en rouge, un meilleur achèvement de la fermentation après addition de vitamine B₁, de même qu'une accélération sensible dans la vinification en blanc (58). Récemment DUPUY et FLANZY (59) ne retrouvent pas d'une façon générale l'augmentation du nombre des levures, l'accélération de la fermentation et l'augmentation de la résistance à l'alcool, mais ne concluent pas cependant à l'inutilité de la thiamine comme adjuvant de la fermentation vinaire.

b) **Mode d'action de la thiamine.** — On sait depuis 1936 (LOHMANN et SCHUSTER) que la cocarboxylase est un ester pyrophosphorique de la thiamine. La thiamine détermine donc la décarboxylation de l'acide pyruvique en éthanal, et accélère de ce fait la vitesse de la fermentation. Mais, comme nous l'avons observé, la vitamine B₁ agit aussi sur la croissance des levures ; elle en augmente la population et prolonge la durée de leur activité. Un essai dans lequel on a compté à la fois les cellules vivantes et les cellules totales, a montré qu'au dixième jour d'une fermentation anaérobie par exemple, la moitié des cellules sont inactives dans le témoin ; en présence de 0,5 mg par litre de vitamine B₁, cette proportion n'atteint au même moment que 21 p. 100 du nombre total relevé à l'hématimètre.

L'addition de 0,5 mg par litre provoque généralement l'activation optimum, mais la thiamine agit aussi, quoique plus faiblement, à dose moindre et même à partir d'additions de 0,1 mg par litre dans certains moûts. Son action reste toujours légèrement inférieure cependant à celle des activateurs d'origine fongique étudiés au chapitre V (voir fig. 7, 8, 9 et 10).

L'accélération de la fermentation provoquée par l'enrichissement du moût en vitamine B₁ se montre très variable d'une année à l'autre. Il semble que certaines années, comme en 1951, une insuffisance de maturité conduisant sans doute à un taux plus faible de vitamine B₁ dans le raisin, l'addition de cette vitamine à la vendange soit très avantageuse, tandis que pour d'autres récoltes, de meilleure maturité, comme en 1953, l'adjonction de la vitamine B₁ ne présente pratiquement aucune utilité.

TABLEAU VII

Addition de divers facteurs de croissance au moût de raisin
Sucre du moût, 172 g par l.

		3 jours	5 jours	8 jours
Témoin	Sucre fermenté.....	43	128	
	Nombre de levures.....	82		125
+ 25 γ p/l Biotine	Sucre fermenté.....	62	148	
	Nombre de levures.....	105		155
+ 10 mg p/l Inositol	Sucre fermenté.....	62	148	
	Nombre de levures.....	102		145
+ 0,5 mg p/l Vitamine B ₁	Sucre fermenté.....	91	169	
	Nombre de levures.....	113		178
+ 25 γ Biotine + 10 mg Inositol + 0,5 mg Vitamine B ₁ }	Sucre fermenté.....	90	170	
	Nombre de levures.....	115		176

Quoiqu'il en soit, de nombreux essais, réalisés sur des moûts très différents, fermentant avec divers *Saccharomyces*, ont montré que la thiamine est de tous les facteurs de croissance celui qui favorise le mieux la fermentation du moût de raisin, particulièrement à ses débuts. Souvent le jus de raisin ne possède pas assez de vitamine B₁ pour donner à la fermentation la vitesse maximum et conduire à l'achèvement le plus sûr. Selon la composition du moût, l'activation produite par l'addition de B₁ est plus ou moins forte, mais toujours réelle. Ces qualités, jointes à son prix de revient relativement peu élevé, pourraient en faire un activateur utile dans la vinification.

III. — Conclusions

La connaissance des besoins en facteurs de croissance des levures de vin en milieu synthétique, apporte une aide précieuse à la caractérisation des levures et à leur classification ultérieure. Elle permet, en outre, de retenir certaines d'entre elles, dont la réponse à un facteur est bien caractéristique, en vue d'un dosage microbiologique de ce facteur.

De nombreuses expériences reproduites pour trois récoltes, d'autre

part, semblent désigner la thiamine comme un activateur souvent efficace de la fermentation alcoolique du moût de raisin. Cependant, les règles d'utilisation pratique de cette vitamine en vinification restent encore à établir. Il faudrait pour cela connaître avec précision les besoins quantitatifs des levures en jeu, et surtout la composition vitaminique exacte des milieux. Il y aurait lieu d'établir une documentation abondante concernant la richesse des raisins en vitamines du groupe B. Le présent travail sur les facteurs de croissance est d'ailleurs une contribution à la solution de ces nouveaux problèmes.

CHAPITRE V

ACTIVEURS DE LA FERMENTATION D'ORIGINE FONGIQUE

Dès 1932, NIELSEN et HARTELIUS (60) ont montré la présence dans le liquide de culture d'*Aspergillus niger* de substances capables d'accélérer la croissance des générations successives de ce champignon. Ils découvrirent plus tard que ces substances sont également actives sur *Saccharomyces cerevisiae* (61) et sur d'autres espèces de levures (62). Ils distinguent deux groupes parmi ces substances, celles qui font partie du Bios proprement dit et celles qui constituent l'activateur d'*Aspergillus*. Ce facteur de croissance spécial, différent des vitamines du groupe B étudiées dans le chapitre précédent, serait très répandu. Il est thermostable et résiste aux conditions d'acidité ou d'alcalinité, il est soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool absolu et l'éther.

Ce facteur n'est jamais indispensable aux levures, mais leur nombre et la vitesse de fermentation dans certains milieux peuvent être doublés en sa présence. Ce facteur est donc différent du « facteur Z » de VON EULER (137), qui accélère la fermentation sans modifier la croissance. Le facteur Z a été rapproché de la thiamine par KÖGL et BORG (138) ; il a été signalé par BRISOU et GENEVOIS dans le jus de raisin et les liquides fermentés (139).

KIESSLING devait préciser en 1949 (63), le mode d'action de l'activateur d'*Aspergillus* : il a pour effet d'augmenter considérablement au début de la fermentation, la formation et l'accumulation des triosephosphates, et par là d'accélérer la fermentation du sucre. RIBÉREAU-GAYON, PEYNAUD et M. LAFON ont démontré que cet activateur facilitait la fermentation glycéropyruvique, ce qui se traduit par une modification profonde des taux des produits secondaires (64) ; d'autre part, la quantité d'acide acétique formée par les levures est diminuée tandis qu'augmente la production d'acide succinique.

L'application à la pratique de la vinification d'une poudre de mycélium d'*Aspergillus niger* contenant l'actif de NIELSEN, a été préconisée (65). RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD dans une série d'essais menés au laboratoire et dans la pratique ont étudié l'emploi de cet actif fongique en vinification (55).

Nous reprenons nous-même ici cette étude. D'autre part, nous avons observé que le mycélium de *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin lavé, desséché et pulvérisé, présente exactement les mêmes propriétés que le mycélium d'*Aspergillus niger*.

D'autres recherches poursuivies sur les mycéliums de *Penicillium* ont permis d'étendre également à ceux-ci la propriété d'agir favorablement sur la fermentation alcoolique. La plupart des moisissures se montrent donc capables de synthétiser l'actif de NIELSEN.

I. — Action de l'actif d'*Aspergillus niger* sur la fermentation alcoolique

Le mycélium frais d'*Aspergillus* a été séché à basse température, moulu finement, lavé à l'alcool qui en extrait les lipides et enlève l'odeur de moisi caractéristique. Il se présente sous forme d'une poudre grise granuleuse, de composition suivante en pourcentage de poids ⁽¹⁾ :

Substances sèches	90,16
Eau	9,84
Cendres	13,69
Substances solubles dans l'eau	9,35
Azote total.....	3,42
Matières protéiques correspondantes	21,45

Nous avons chiffré tout d'abord l'activation obtenue en fonction du poids de mycélium sec utilisé. Le graphique n° 5 donne les courbes de fermentation obtenues pour un moût de raisin ayant 210 g de sucre par litre, fermentant à 25°C, à l'abri de l'air, en présence de 0,08, 0,5 et 2 g de produit. 80 mg de mycélium par litre correspondant seulement à 7,4 mg de substances solubles, assurent par rapport au témoin, une avance de 33 g de sucre fermenté, soit environ 2° Baumé. Pour les additions de 0,5 à 1 g l'écart avec le témoin est plus marqué et atteint une cinquantaine de grammes. Mais 2 g par litre ont seulement un effet comparable à celui de 80 mg. Le graphique n° 6 représente la multiplication des levures dans les mêmes conditions. En fin de fermentation, le nombre total des levures est accru de 45 p. 100 avec l'addition la plus faible, et de 80 p. 100 avec un demi gramme par litre, dose qui produit l'activation optimum.

Non seulement l'actif d'*Aspergillus* augmente la population des levures, mais encore il prolonge très nettement leur phase d'activité. Un essai effectué sur un moût de 13° Baumé, montre qu'au dixième jour de la fermentation par exemple, le nombre total des levures relevé à

⁽¹⁾ Communiquée par la firme Boehringer Sohn, à Ingelheim.

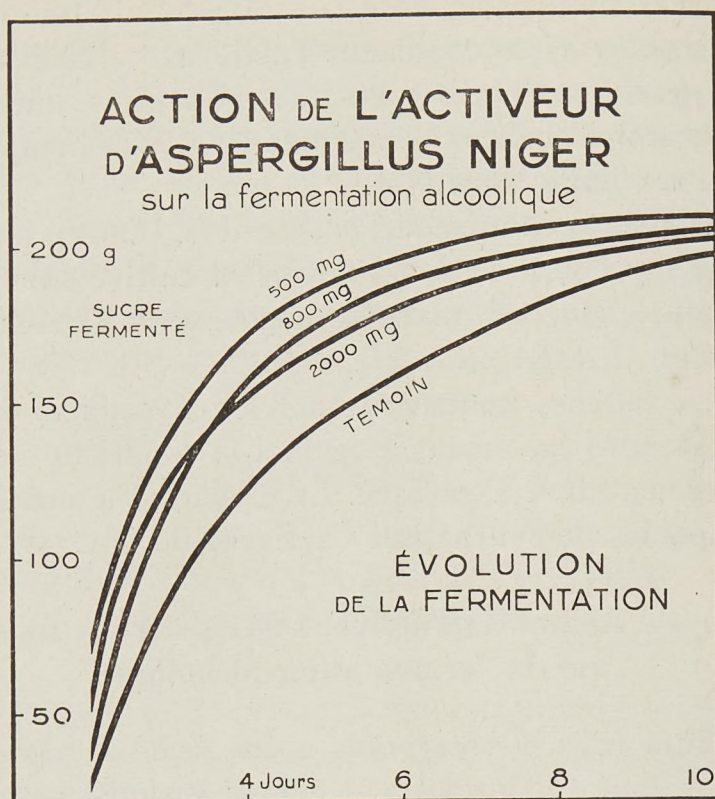


FIG. 5

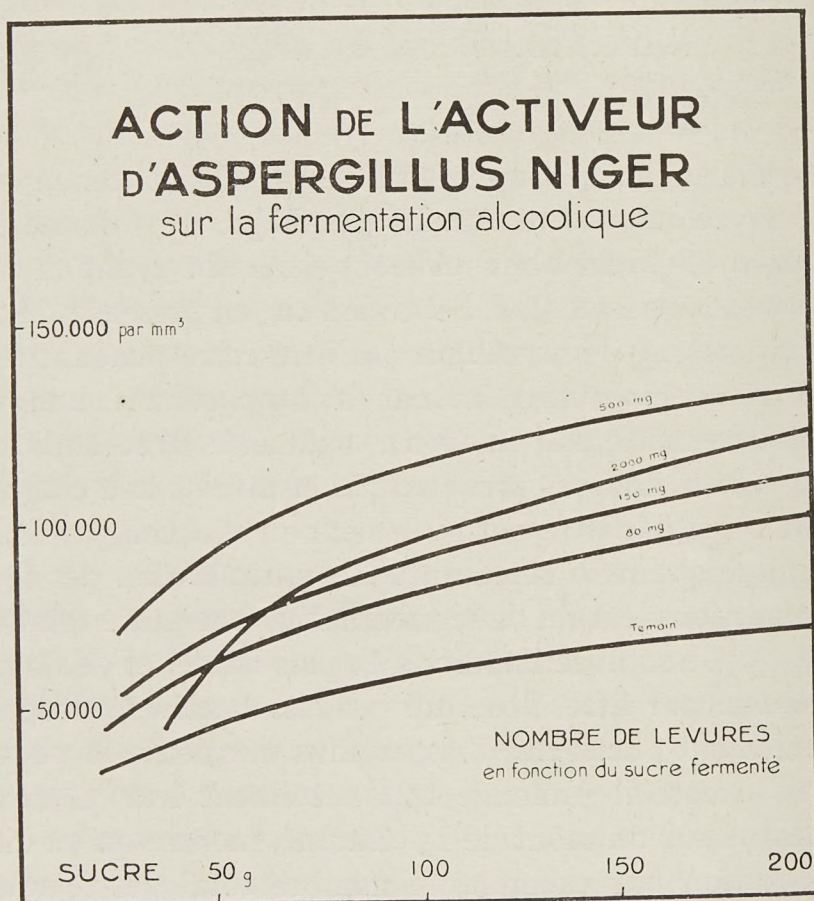


FIG. 6

l'hématimètre est supérieur de 28 p. 100 à celui du témoin. Mais en réalité, l'écart est beaucoup plus considérable lorsqu'on considère le nombre des cellules vivantes, comptées sur milieu solide. Alors que le témoin n'accuse que 20 000 levures vivantes par mm³, ce chiffre atteint plus du double dans la fermentation activée, soit 440 00 levures. La phase de dégénérescence des levures qui, on l'a vu, est très rapide à l'abri de l'air, est ici retardée de 8 jours, ce qui permet une fermentation plus rapide et plus complète.

L'efficacité de cet activateur est encore accrue dans les moûts botrytisés. De très nombreux essais effectués avec des moûts de raisin prélevés au moment des vendanges dans diverses régions du Bordelais, fermentant spontanément avec les levures du cru, ont montré que, quelle que soit la fermentescibilité originale, celle-ci est toujours améliorée par un apport d'activateur. En outre, dans le cas de mises en refermentation de vins rouges restés accidentellement sucrés, il permet une disparition du sucre plus rapide, sans augmenter notablement du reste la multiplication des levures (66).

Si l'activateur d'*Aspergillus niger* rend possible un meilleur départ de la fermentation à basse température, il permet par ailleurs une transformation du sucre plus complète, dans le cas d'une fermentation se déroulant à température trop élevée. C'est ainsi que la fermentation d'un moût de 13° Baumé, s'opérant à l'abri de l'air à une température de 37°C, s'arrête lorsque 902 d'alcool sont formés, tandis que dans les mêmes conditions expérimentales, la fermentation se poursuit jusqu'à 1002, en présence de 0,5 g par litre de poudre de mycélium.

Une étude comparative des divers activateurs étudiés (éthanal et acide pyruvique, sulfate d'ammoniaque, vitamine B₁ et mycélium d'*Aspergillus niger*) nous a permis d'établir les courbes des figures 7, 8, 9 et 10. On voit que l'activateur de NIELSEN est celui qui agit le plus fortement tant sur la multiplication des levures que sur l'évolution de la fermentation. Dans un moût de raisin ayant 220 g de sucre par litre et fermentant à 25° à l'abri de l'air, l'addition de 0,5 mg par litre de vitamine B₁ a provoqué par rapport au témoin, une avance de 12 g de sucre fermenté au douzième jour ; l'avance n'est que de 7 g par l'introduction de sulfate d'ammoniaque, mais elle atteint 28 g, soit 105, avec 0,5 g de mycélium. En fin de fermentation le sucre restant est de 55 g dans le moût témoin, de 45 g dans les milieux enrichis en vitamine B₁ ou en azote ammoniacal et de 17 g seulement dans le moût activé par le mycélium d'*Aspergillus*.

Dans une fermentation aérobie par contre, les activateurs précités se comportent sensiblement tous de la même manière, tandis que l'introduction d'éthanal ou d'acide pyruvique joue un rôle activant plus discret.

Par ailleurs, les activations provoquées dans un moût par le mycélium d'*Aspergillus* et par la vitamine B₁ sont additives. Le tableau VIII ci-après en donne un exemple.

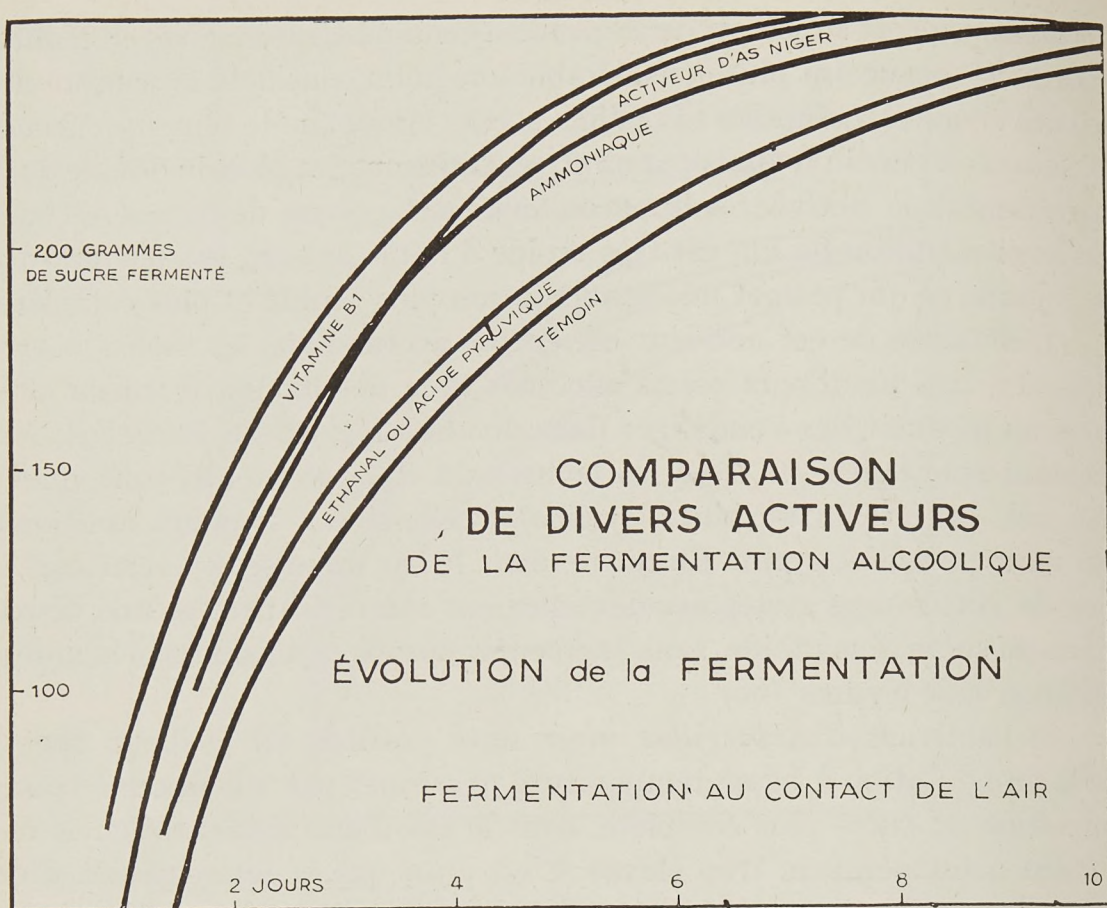


FIG. 7

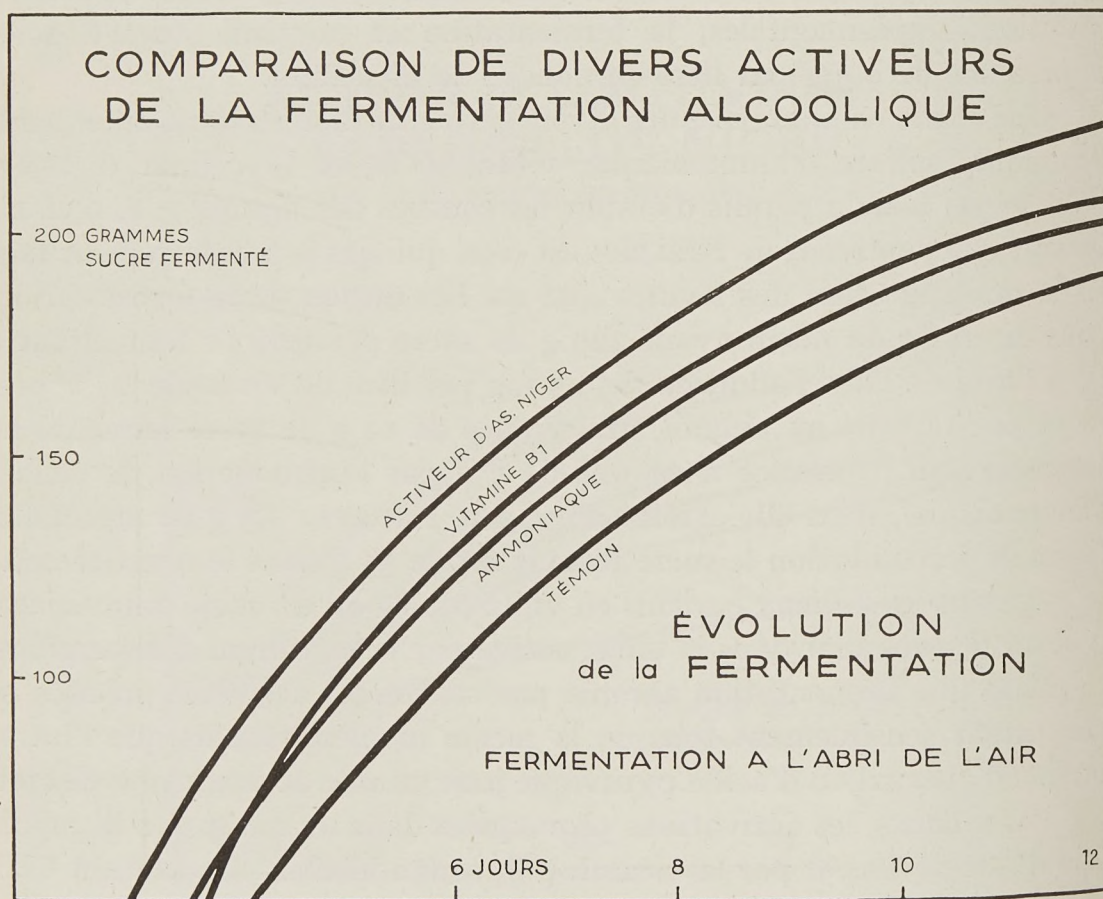


FIG. 8

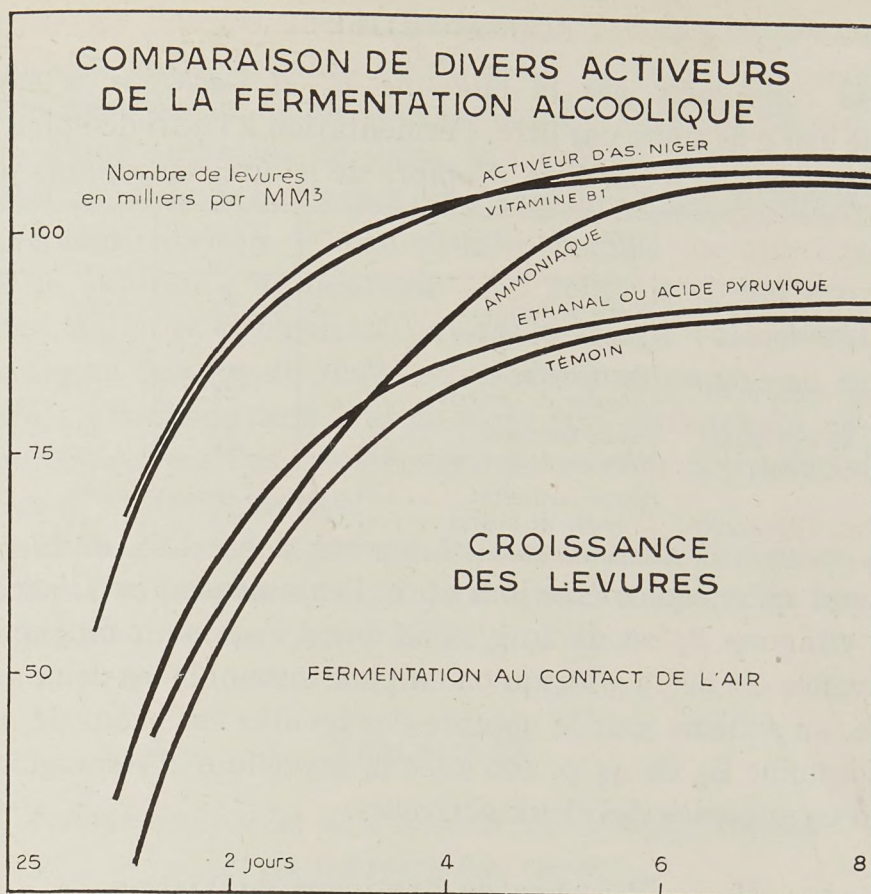


FIG. 9

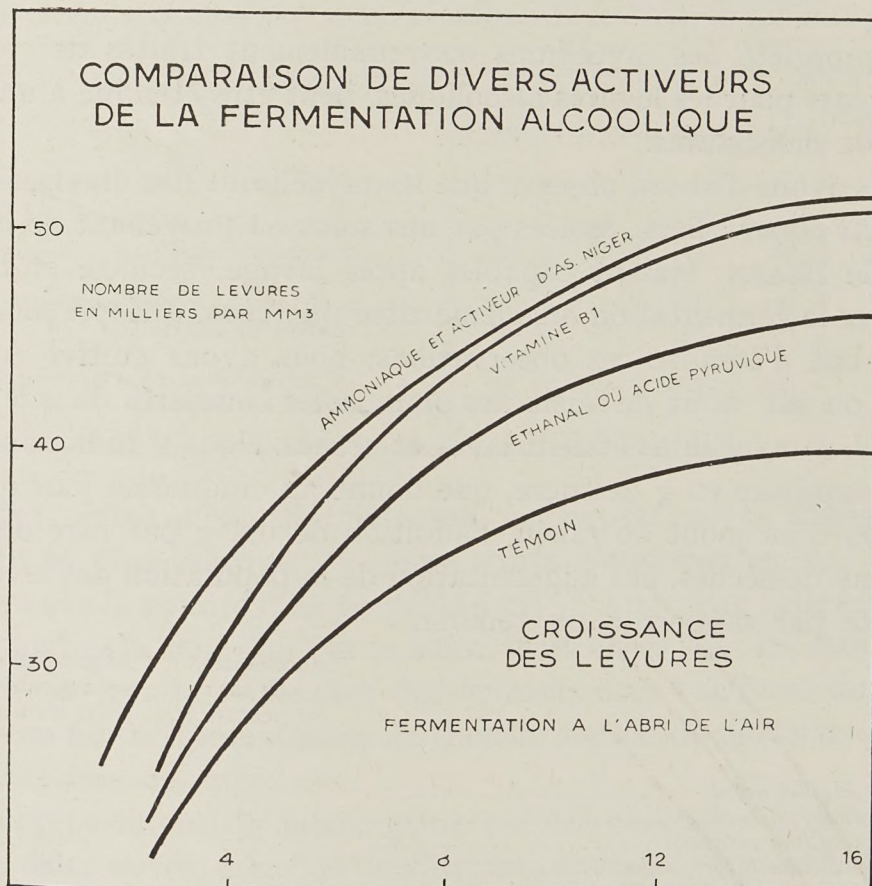


FIG. 10

TABLEAU VIII

Activations conjuguées par la vitamine B₁ et l'activeur d'*Aspergillus*
Moût de 250 g de sucre par litre, Fermentation à l'abri de l'air à 25°C.
Sucre fermenté en g par litre. Nombre de levures en milliers par mm³.

		2 jours	4 jours	6 jours
Témoin	Sucre fermenté.....	12	130	168
	Nombre de levures	19	34	45
+ 0,5 mg vitamine B ₁	Sucre fermenté.....	23	179	191
	Nombre de levures	26	47	55
+ 0,5 g de mycélium d' <i>Aspergillus</i>	Sucre fermenté.....	33	189	221
	Nombre de levures	27	53	65
+ B ₁ et + mycélium d' <i>Aspergillus</i>	Sucre fermenté.....	50	209	238
	Nombre de levures	33	70	73

On voit qu'au quatrième jour après l'ensemencement, l'accélération due à la vitamine B₁ est de 49 g, celle due à l'activeur fongique est de 59 g ; l'avance est de 79 g lorsqu'on emploie ensemble les deux activeurs. De même, au sixième jour le nombre des levures est accru de 22 p. 100 avec la vitamine B₁, de 44 p. 100 avec le mycélium d'*Aspergillus*, et de 62 p. 100 en présence des deux activeurs.

II. — Présence de l'activeur de Nielsen
dans les mycéliums de *Botrytis* et de *Pénicilliums*

La propriété des mycéliums convenablement traités de constituer des activeurs pour les levures alcooliques, peut être étendue à un certain nombre de moisissures.

Nous avons d'abord observé que les mycéliums des diverses souches de *Botrytis cinerea* Pers., isolées par nos soins ou provenant de la mycothèque de BAARN, étaient capables après lavage, séchage et broyage, d'accélérer la fermentation au même titre que ceux d'*Aspergillus niger*. Dans le but d'étendre ces observations, nous avons cultivé sur moût de bière ou sur moût de raisin, les organismes énumérés dans le tableau suivant. Les mycéliums étaient lavés et séchés. Nous y indiquons l'accélération exprimée en g de sucre, que donne au cinquième jour de la fermentation d'un moût de raisin, l'addition de 0,5 g par litre des divers mycéliums desséchés, et l'augmentation de la population des levures qui en résulte par rapport à un témoin.

	Accélération de la fermentation g de sucre	Augmentation du nombre des levures p. 100
<i>Aspergillus oryzae</i>	58	0
<i>Penicillium urticae</i>	57	0
<i>Penicillium notatum</i>	77	50
<i>Penicillium chrysogenum</i>	54	28
<i>Botrytis cinerea</i> , albino sclerotia.....	59	32
<i>Botrytis cinerea lini</i>	58	20

Activeurs du Botrytis cinerea. Le *Botrytis cinerea* se cultive facilement à la surface du moût de raisin ou du moût de bière. Les modalités de culture sont exposées en détail dans le chapitre VIII. Après une période de culture d'une quinzaine de jours, le mycélium d'une souche de *Botrytis* isolé d'un raisin de Sauternes est séparé du milieu. Il est déchiqueté, broyé, lavé plusieurs fois à l'eau distillée bouillie (ce qui a pour effet d'extraire la substance antibiotique qu'il contient et qui sera étudiée au chapitre VIII), et déshydraté par traitement à l'alcool absolu. On sèche ensuite au-dessous de 100°C et on réduit en poudre au mortier.

Ajoutées à la même dose dans un moût sain, cette poudre de *Botrytis* et la poudre d'*Aspergillus*, manifestent un pouvoir activant à peu près identique sur la fermentation.

La tableau ci-dessous permet la comparaison des deux produits ajoutés à la même dose de 0,5 g par litre à un moût de raisin ayant 230 g de sucre par litre, fermentant à l'abri de l'air.

TABLEAU IX

*Actions comparées de l'acteur du Botrytis cinerea
et de l'Aspergillus niger*

Moût de 230 g de sucre. Fermentation à l'abri de l'air à 25°.

Sucre fermenté en g par litre. Nombre de levures en milliers par mm³.

		2 jours	4 jours	8 jours	12 jours	Sucre restant après 18 jours
Témoin.....	Sucre fermenté.....	16	83	159	182	38
	Nombre de levures.....	26	31	42	52	
Acteur d' <i>Aspergillus</i> .	Sucre fermenté.....	22	117	180	195	16
	Nombre de levures.....	31	43	51	63	
Acteur de <i>Botrytis</i> ..	Sucre fermenté.....	40	130	180	195	11
	Nombre de levures.....	32	43	50	62	

L'effet activant du *Botrytis* est, au départ de la fermentation, nettement le plus marqué : 2 jours après l'ensemencement, l'avance provoquée par la poudre d'*Aspergillus* est de 6 g par litre ; elle est de 24 g avec la poudre de *Botrytis*. Par la suite, leurs effets sont du même ordre, de même que sur la croissance des levures, mais l'acteur du *Botrytis* a permis en fin de fermentation, la transformation de quelques grammes supplémentaires de sucre.

Des préparations du même genre ont été effectuées avec les mycéliums de deux autres souches de *Botrytis cinerea*, d'origines hollandaise et italienne. Dans un essai, les activations de fermentation provoquées

par des additions de 0,5 g par litre dans un moût de raisin, ont été les suivantes :

	Témoin	+ Mycélium Botrytis cinerea Baarn	+ Mycélium Botrytis cinerea Pérouse
Sucre restant après 3 jours.....	232	182	176
Sucre restant après 6 jours.....	142	12	10
Acide acétique formé (még)	14,6	12,2	9,2

Le tableau donne encore le taux d'acide acétique formé, plus faible en présence d'actifur que dans le témoin, comme cela s'observe avec l'actifur d'*Aspergillus*.

Il est donc vraisemblable que ces diverses moisissures synthétisent la même substance activante, ou le même groupe de substances, et de plus à des taux très voisins.

III. — Conclusions

Le moût de raisin est un milieu de fermentation dont la composition est très variable d'un cépage à un autre, d'une condition à une autre, d'une année à une autre. Une addition d'azote ammoniacal qui se montre favorable au cours d'une vinification, peut être absolument sans effet l'année suivante, si les conditions de la maturation ont amené une richesse suffisante du moût en cet élément. La même observation est valable pour la vitamine B₁ qui par exemple favorisa la fermentation en 1951 et fut presque sans action en 1953.

Les actifs d'origine fongique peuvent dans une certaine mesure suppléer à eux seuls à une carence azotée ou vitaminique, mais d'autre part ils favorisent toujours la fermentation alcoolique, quelles que soient la composition du milieu de culture et sa richesse en éléments nutritifs pour les levures. Ils agissent à très faible dose, si l'on considère qu'à peine le dixième de la dose employée est soluble dans l'eau et réellement efficace. Ils ne modifient ni le goût, ni le bouquet du produit fini.

Les conséquences pratiques de ces observations sont importantes, puisqu'il faut admettre que ces produits actifs existent dans les raisins pourris (à côté de substances inhibitrices) et qu'ils jouent nécessairement un rôle dans la vinification, dans les régions où la vendange est attaquée par la « pourriture noble ».

D'autre part, l'addition à la vendange de mycéliums de diverses moisissures ayant subi, bien entendu, un traitement spécial pour les désodoriser, les stabiliser et les réduire en poudre, constituerait une pratique favorable à bien des égards pour obtenir chaque année des fermentations plus faciles, plus rapides et plus régulières, donnant des vins d'acidité

volatile moins élevée. Les fabriques d'acide citrique de fermentation, les fabriques d'antibiotiques peuvent livrer de tels activeurs.

A côté des produits utilisés jusqu'à maintenant pour activer et régulariser la fermentation dans la pratique de la vinification, qu'on peut considérer comme des aliments plastiques des levures et, qui ne sont pas toujours opérants, doit s'inscrire une nouvelle catégorie de produits, appelés à un grand avenir, les activeurs vitaminiques : vitamine B₁ et surtout produits d'origine fongique.

(à suivre)

COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DOSAGE DES ALDEHYDES DANS LES EAUX-DE-VIE

PAR

J. LAFON et P. COUILLAUD

Station Viticole de Cognac

PLAN DU MÉMOIRE

- I. — Introduction.
 - II. — Dosage acidimétrique des aldéhydes.
 - III. — Dosage iodométrique.
 - IV. — Dosage colorimétrique.
 - Travaux antérieurs.
 - Observations colorimétriques.
 - Étude du dosage colorimétrique.
 - A) Solutions d'Éthanal.
 - 1^o Évolution de la coloration en fonction du temps et de la température.
 - 2^o Évolution de la coloration en fonction de la teneur en aldéhydes.
 - B) Solutions d'Acétal.
 - C) Aldéhydes autres que l'Éthanal.
 - Composition du Réactif de SCHIFF.
 - 1^o Influence du pH.
 - 2^o Influence de la quantité d'anhydride sulfureux.
 - 3^o Influence de la fuschine.
 - Alcool utilisé pour effectuer les dilutions.
 - Technique opératoire proposée.
 - Valeur de la méthode :
 - a) Influence des impuretés perturbatrices.
 - b) Comparaison avec la méthode JAULMES.
 - c) Comparaison avec la méthode officielle.
 - V. — Conclusion.
-

I. — INTRODUCTION

Plusieurs méthodes ont été proposées pour doser les aldéhydes. Nous avons comparé les trois principales méthodes appliquées au cas des eaux-de-vie et effectué divers essais dans le but de rechercher

une méthode suffisamment exacte, mais aussi rapide et utilisable sans précautions spéciales, pouvant convenir en particulier au travail en série.

II. — DOSAGE ACIDIMÉTRIQUE DES ALDÉHYDES (1)

Principe

La fonction aldéhyde se combine avec le chlorhydrate d'hydroxylamine avec formation de l'aldoxime correspondante et libération d'acide chlorhydrique qui est titré avec une solution acidimétrique.



Cette méthode utilisée par le Monopole Allemand, présente l'inconvénient de ne pas donner des virages nets, avec les indicateurs usuels : méthyl orange, rouge de méthyl, bleu de bromothymol. Le graphique ci-joint qui représente la courbe d'électrotitrage indique que la solution aqueuse d'hydroxylamine est à $pH = 3,5$ ou 4 suivant la concentration.

L'addition de la prise d'essai contenant les aldéhydes fait descendre le pH à une valeur qui est fonction de la quantité d'acide libéré, acide que l'on sature ensuite par une solution titrée de soude. L'emploi d'un pH-mètre permet d'effectuer le dosage. On prend le pH de la solution de chlorhydrate d'hydroxylamine, puis, après addition de la prise d'essai, on revient au pH initial à l'aide d'une solution de soude titrée. On déduit alors la quantité d'aldéhyde de la quantité de soude utilisée.

Observations

1° La méthode conduit à utiliser des prises d'essai très importantes et des volumes de soude titrée trop faibles pour les solutions à faible teneur en aldéhydes.

Elle n'est pas utilisable pour les teneurs inférieures à 10 g/hl d'alcool pur.

2° La présence d'alcool introduit avec la prise d'essai d'eau-de-vie diminue la dissociation des électrolytes et élève le pH. Il conviendrait alors pour obtenir des résultats exacts, de préparer la solution de chlorhydrate d'hydroxylamine dans un milieu hydroalcoolique au même degré que la prise d'essai. Il convient en outre d'amener la prise d'essai d'eau-de-vie au même pH que la solution de chlorhydrate d'hydroxylamine avant le mélange.

Enfin, il est bon d'opérer au degré le plus bas possible, car les variations de pH au cours du dosage sont d'autant plus faibles que le degré est plus élevé.

Nous avons utilisé la technique suivante :

— Faire une solution à 0,15 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 100 ml d'alcool sans aldéhydes à 25 c.

Déterminer son pH, soit pH 2.

— La prise d'essai de 100 ml d'eau-de-vie à 50 c, après avoir été amenée à 25 c par 100 ml d'eau distillée sera amenée à pH A.

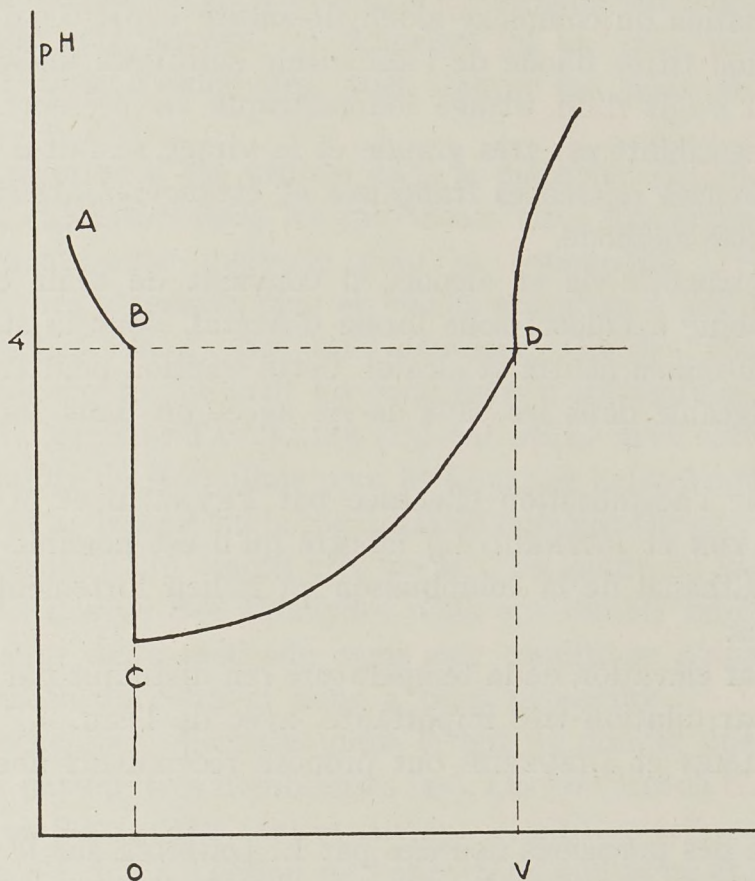


FIG. 1. — Courbe d'électrotitrage de l'éthanal par le chlorhydrate d'hydroxylamine.

— Mélanger les deux solutions.

— Revenir à pH A au moyen de NaOH/N/50, soit V ml.

— Il y a $V \times 1,76$ g Éthanal/hl d'alcool à 100 c. Cette méthode donne des résultats corrects.

Cependant :

— On n'obtient pas de paliers ascendants très nets en fin de titrage, la précision reste faible.

— On doit utiliser des prises d'essai très importantes et la méthode ne convient que pour les alcools très riches en aldéhydes.

— Pour doser l'Acétal, il faut faire une hydrolyse préalable.

III. — DOSAGE IODOMÉTRIQUE DES ALDÉHYDES

Un dosage de l'Éthanal, dérivé du procédé Tomoda a été donné par MM. JAULMES et ESPEZEL (2).

Principe

1° Combinaison en milieu neutre de l'Éthanal et du bisulfite de sodium ou potassium.

2° Oxydation à pH inférieur à 2 de l'excès de bisulfite par l'iode.

3° Dissociation du complexe aldéhydo-sulfite à pH 8,5-9 et dosage par une solution titrée d'iode de l'anhydride sulfureux libéré.

Comme il s'agit d'un titrage iodométrique en présence d'empois d'amidon, la sensibilité est très grande et le virage se fait à la goutte.

De nombreuses références françaises et étrangères attestent de la précision de cette méthode.

Dans les eaux-de-vie et alcools, il convient de tenir compte de l'Éthanal combiné à l'alcool sous forme d'Acétal, dont la stabilité est bien connue en milieu neutre et alcalin. Cette fraction peut très bien ne pas être négligeable dans les eaux-de-vie âgées ou dans les alcools à degré élevé.

L'étude de l'acétalisation effectuée par PEYNAUD et MAURIE (3), RIBEREAU GAYON et PEYNAUD (4) montre qu'il est possible de libérer rapidement l'Éthanal de la combinaison en milieu fortement acide de deux manières.

— Soit par élévation de la température (en distillant par exemple).

— Soit par dilution très importante, avec de l'eau.

MM. JAULMES et DIEUZEDE ont proposé récemment une nouvelle technique (5).

A la suite des précisions données par L. DEIBNER sur le dosage de petites quantités de SO_2 nous ajoutons 2 à 3 ml d'iodure de potassium ⁽¹⁾, à 21 p. 100 avant les additions d'iode. Cette addition de IK réduit à une valeur négligeable la consommation d'iode en l'absence d'aldéhydes (0,15 à 0,20 ml N/50 en l'absence de IK). En outre, nous effectuons le titrage final par l'iode en atmosphère de CO_2 , ainsi quelle que soit la durée de ce titrage, l'influence de l'air est nulle.

Observations

Les aldéhydes autres que l'Éthanal sont en grande partie sinon en totalité dosés par cette méthode, comme l'Éthanal. Mais, comme ces aldéhydes sont toujours dans les spiritueux en quantités très faibles, cela n'a pas d'inconvénient sensible.

D'ailleurs, aucune des méthodes que nous indiquons dans ce texte n'est à l'abri de cette cause d'erreur.

⁽¹⁾ DEIBNER. — Sur les particularités du dosage iodométrique de petites quantités d'anhydride sulfureux libre et combiné à l'Acétaldéhyde en solution diluée et en particulier dans les distillats de vin. *Annales de Technologie*, III-1953. Deibner L., Station centrale d'œnologie, Narbonne.

IV. — MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE AU BISULFITE DE ROSANILINE

La coloration en présence des aldéhydes de la fuschine, préalablement décolorée par l'acide sulfureux a été signalée par SCHIFF en 1865 (6) et préconisée par MEYER (7) SCHMIDT (8) en 1881 pour déceler de faibles quantités d'aldéhydes, puis GAYON (9) pour en effectuer le dosage.

Cette réaction a été utilisée dans la méthode officielle française de dosage des aldéhydes dans les spiritueux (10). TOURLIÈRE et ANDRÈS recommandent cette méthode pour sa commodité (11). Cependant, utilisée par des chimistes plus ou moins entraînés à ces dosages, elle a donné de telles erreurs (12) qu'il convient, soit de l'abandonner, soit d'en préciser rigoureusement les conditions d'applications.

MM. JACQUIN et TAVERNIER (13) ont utilisé avec succès la réaction avec le bisulfite de Rosaniline pour le dosage de l'alcool méthylique après oxydation en se basant sur la constatation faite par DENIGES (14) que seul le formol recolore, un réactif très acide. C'est pourquoi les erreurs obtenues lors du dosage des aldéhydes nous ont semblé imputables non au principe même de la méthode, mais aux conditions d'application. Une étude détaillée de celles-ci nous a paru nécessaire.

Les recherches effectuées dans le but de donner une explication à la réaction ont été très nombreuses (15). Les travaux de G. URBAIN (16), WIELAND et SCHLEUING (17) et surtout P. RUMPF (18) ont montré que la réaction est due à l'action de l'anhydride sulfureux et des aldéhydes sur un acide fuschine leucosulfonique incolore avec formation d'un complexe coloré soluble dont l'hydrolyse entraîne la destruction progressive.

Parallèlement, une partie des aldéhydes se combine à l'anhydride sulfureux pour former de l'acide aldéhydosulfureux qui n'entre pas dans la formation du complexe.

On est donc en présence d'une série de réactions qui conduisent à un équilibre peu stable dont il conviendra d'étudier les facteurs : température, pH, quantités respectives de corps en présence (fuschine, anhydride sulfureux, aldéhydes), etc.

Ensuite, il sera nécessaire de fixer chaque facteur à la valeur optimum entraînant un dosage correct, c'est-à-dire une réaction sensible et toujours identique.

Comme il s'agit d'une réaction colorimétrique, nous préciserons tout d'abord dans quelles conditions ont été évaluées les densités optiques.

OBSERVATIONS COLORIMÉTRIQUES

La colorimétrie est basée sur les Lois de LAMBERT et de BEER établissant une relation entre l'absorption et d'une part l'épaisseur de la couche absorbante (LAMBERT), d'autre part, la concentration (BEER) (loi exponentielle).

Certaines réactions colorimétriques ne suivent pas ces lois. L'interprétation des colorations développées est alors délicate et nécessite l'emploi de courbes établies point par point dans des conditions déterminées. L'utilisation de ces courbes ne peut se faire que dans des conditions rigoureusement identiques, en particulier la composition spectrale de la lumière utilisée doit toujours être la même.

Les colorations sont parfois perturbées par des impuretés. Il faut donc étudier dans le cas d'un dosage colorimétrique l'importance des perturbations possibles.

L'appareil que nous avons utilisé (VBC n° 38 P 53) est un photolorimètre à cellules Césium ou Antimoine. Cet appareil est basé sur le procédé de compensation par deux cellules montées en opposition et suivies d'un amplificateur sumétrique, le zéro étant indiqué par un galvanomètre.

Un tel appareil, utilisé dans de bonnes conditions, présente peu de défauts et quelques avantages appréciables sur les colorimètres optiques.

— Possibilité de faire des mesures en valeur absolue, donc sans témoin de comparaison.

— Utilisation possible quelles que soient les conditions d'éclairage extérieur.

— Rapidité des mesures.

— Résultats indépendants de l'opérateur.

— Bonne précision et fidélité.

ÉTUDE DU DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DES ALDÉHYDES

— Nous avons tout d'abord utilisé une solution de bisulfite de Rosaniline, préparée suivant les données de la méthode officielle.

Nous avons effectué les observations sous une épaisseur constante de 10 millimètres que nous avons trouvé la plus favorable avec le photomètre utilisé.

Avec l'Éthanal, le maximum d'absorption a lieu entre 5 600 et 5 700 Å. Il est bon de prévoir des filtres appropriés.

ALDEHYDES

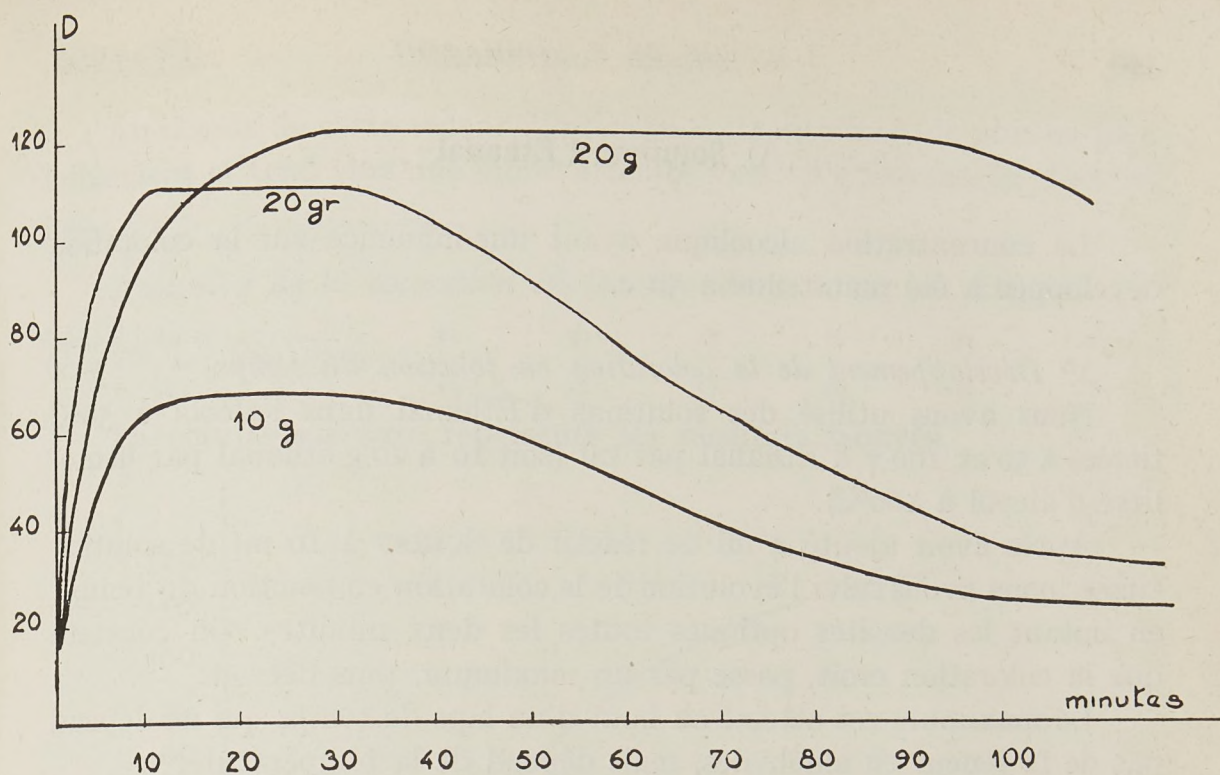


FIG. 2. — Évolution de la coloration en fonction du temps.

ALDEHYDES

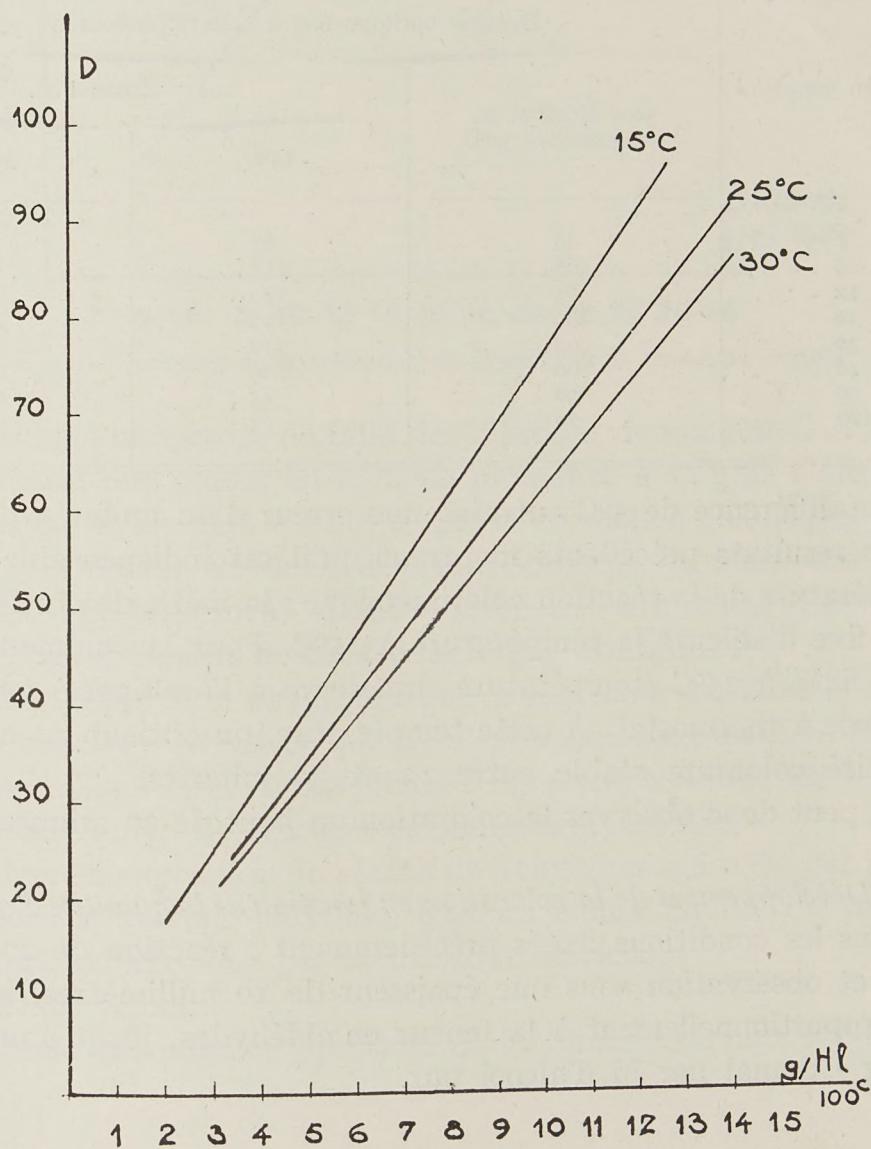


FIG. 3. — Influence de la température.

A) Solution d'Éthanal

La concentration alcoolique ayant une influence sur la coloration développée a été maintenue à 50 c.

1° Développement de la coloration en fonction du temps.

Nous avons utilisé des solutions d'Éthanal dans l'alcool à 50°C titrées à 50 et 100 γ d'Éthanal par ml (soit 10 à 20 g éthanal par hectolitre d'alcool à 100°C).

Après avoir ajouté 4 ml de réactif de SCHIFF à 10 ml de solution titrée, nous avons suivi l'évolution de la coloration en fonction du temps, en notant les densités optiques toutes les deux minutes. On constate que la coloration croît, passe par un maximum, puis décroît.

Le maximum est atteint au bout d'un laps de temps qui ne dépend pas de la teneur en aldéhydes, mais dépend de la température.

Le tableau suivant rassemble les résultats trouvés.

Temps en minutes	Densités optiques lues à l'électrophotomètre		
	50 γ Éthanal cc. température 30°C	100 γ Éthanal cc.	
		14°C	30°C
4	48	87	60
10	66	111	95
12	69	112	98
20	69	112	115
30	69	112	123
40	60	109	123
90	30	45	123
120	20	25	108

Une différence de 5°C entraîne une erreur d'au moins 5 p. 100.

Les résultats précédents montrent qu'il est indispensable de fixer la température de la réaction colorimétrique ; la méthode officielle Américaine fixe d'ailleurs la température à 15°C. Pour la commodité, nous l'avons fixée à 25°C (température supérieure à l'ambiance) grâce à un bain-marie à thermostat. A cette température, on obtient un maximum d'intensité colorante stable entre 12 et 30 minutes.

On peut donc observer la coloration au bout de 20 minutes.

2° Développement de la coloration en fonction de la quantité d'aldéhydes.

Dans les conditions fixées précédemment : réaction de 20 minutes à 25°C et observation sous une épaisseur de 10 millimètres, la densité varie proportionnellement à la teneur en aldéhydes, jusqu'à une teneur de 13 g Éthanal par hl d'alcool pur.

Au-dessus de cette teneur, l'intensité colorante croît de plus en plus faiblement et tend vers une limite atteinte vers 28 g Éthanal/hl d'alcool pur.

Evolution de la coloration en fonction de la teneur en Ethanal

Éthanal pour cc	15	30	45	60	90	120
Déviatiion de l'électrophotomètre	19	38	57	76	100	114

La courbe suivante représente les résultats trouvés.

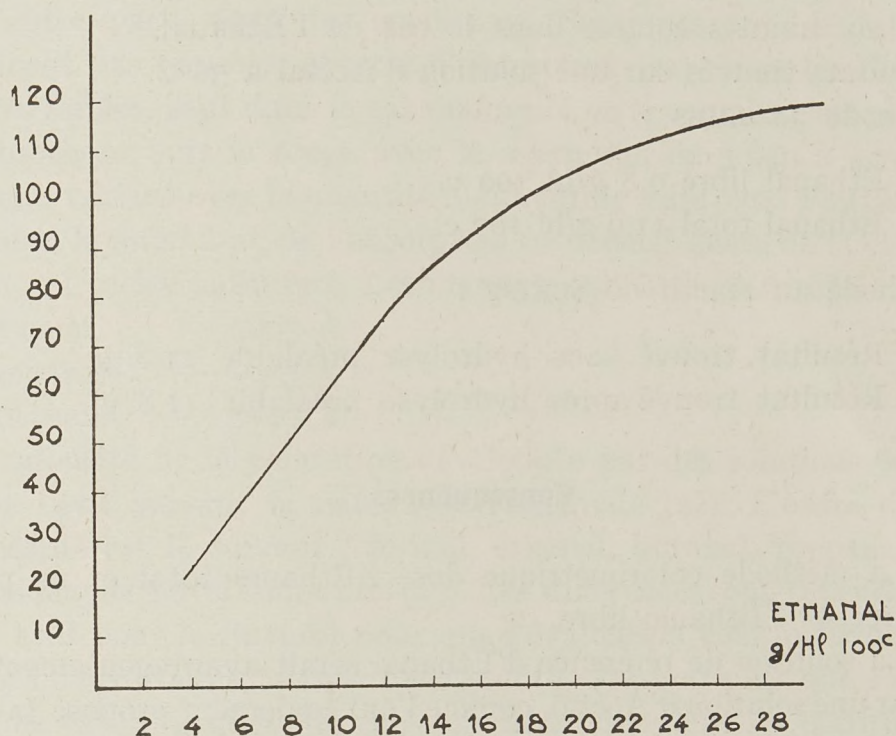


FIG. 4. — Évolution de la coloration en fonction de la teneur en éthanal.

Il est donc nécessaire de faire des dilutions de manière à avoir dans la prise d'essai une teneur en Éthanal inférieure à 14 g/hl d'alcool pur.

CUNIASSE avait déjà remarqué que la coloration n'était pas proportionnelle à la teneur en aldéhydes (19), BONIS (20) a donné des chiffres permettant l'établissement d'une courbe de correction. Ces chiffres sont d'ailleurs différents de ceux donnés par CUNIASSE.

On doit cependant remarquer que *la courbe donnée dans la méthode officielle française n'est valable que si on opère dans des conditions rigoureusement semblables à celles qui ont présidé à son établissement* : c'est-à-dire :

- Même durée de réaction et même température.
- Même composition du réactif de SCHIFF (ce qui n'est pas possible comme nous le verrons plus loin, tout au moins dans le cas du mode de préparation préconisé par la méthode officielle).
- Même témoin.
- Même composition spectrale de la lumière servant à l'observation, etc.

B) Solutions d'Acétal

Le réactif de SCHIFF agissant en présence d'un excès d'anhydride sulfureux et en milieu très acide, l'hydrolyse de l'Acétal et le développement de la coloration sont réalisés en même temps. Les courbes de développement de la coloration avec des solutions d'Acétal sont identiques à celles obtenues avec des solutions d'Éthanal. A 25°C hydrolyse et combinaison sont terminées en 15 minutes. L'observation peut se faire au bout de 20 minutes comme dans le cas de l'Éthanal.

Résultats trouvés sur une solution d'Acétal à 50°C.

Méthode JAULMES :

Éthanal libre 0,8 g/hl 100 c.

Éthanal total 11,9 g/hl 100 c.

Méthode au réactif de SCHIFF :

Résultat trouvé sans hydrolyse préalable 11,8 g.

Résultat trouvé après hydrolyse préalable 11,8 g.

Conséquences

1° La méthode colorimétrique dose l'Éthanal total et ne permet pas de préciser l'Éthanal libre.

2° La solution de référence d'Éthanal serait avantageusement remplacée par une solution d'Acétal, comme l'ont également proposé JAULMES et DIEUZEDE (5).

En effet l'Acétal :

- est peu volatil,
- ne se polymérise pas,
- les pesées en sont très faciles,
- les solutions légèrement alcalinisées sont très stables.

Ceci supprimerait les erreurs considérables faites par certains chimistes, qui ont utilisé pour la préparation des liqueurs types, de l'Éthanal sans l'avoir redistillé pour le dépolymériser (13).

Préparation de la solution type :

On peut préparer une solution mère à 20 g Éthanal/hl alcool à 100°C. Pour cela, il suffit de diluer 268,6 mg d'Acétal pur par litre d'alcool à 50°C exempt d'aldéhydes et légèrement alcalinisé. Cette solution pourra servir à l'étalonnage des courbes en effectuant des dilutions.

Étant donné qu'on ne trouve pas toujours de l'Acétal rigoureusement pur, il convient de vérifier le titre de la solution par la méthode JAULMES et d'ajuster ce titre s'il y a lieu.

C) Aldéhydes autres que l'Éthanal

Le temps au bout duquel la coloration maximum est atteinte varie suivant la nature des aldéhydes.

Par exemple :

Formol = maximum atteint au bout de 2 heures ;

Éthanal = maximum atteint au bout de 20 minutes.

Il y a là une cause d'erreur à laquelle il est difficile d'échapper.

D'autre part, dans des conditions identiques tous les aldéhydes ne donnent pas le même spectre d'absorption (21). Mais les différences sont très faibles, sauf dans le cas du formol où le complexe est nettement plus absorbant vers le rouge avec le maximum de 5 640 à 5 700 Å, ce maximum variant avec la quantité d'anhydride sulfureux. Pour les autres aldéhydes, le maximum de l'absorption ne dépend guère de la concentration en anhydride sulfureux. Les maxima sont à ± 10 Å près.

Éthanal — 5605 Å

Propanal — 5625 Å

Butanal — 5640 Å

L'intensité de la coloration développée par des solutions équimoléculaires varie suivant la nature de l'aldéhyde (22). L'ordre d'activité décroissante est le suivant : formol, éthanal, butanal, propanal, isobutanal, aldéhyde isovalérique etc. (23). Les différences sont cependant assez faibles sauf pour le furfurol pour que l'évaluation colorimétrique puisse être considérée comme voisine de la réalité, d'autant plus que l'aldéhyde éthylique est de beaucoup celui qui prédomine dans les spiritueux. On doit en outre signaler que les autres méthodes n'échappent pas à cette cause d'erreur.

Composition du réactif de Schiff

Nous avons constaté que les résultats obtenus avec des solutions de réactif de SCHIFF préparées à plusieurs jours d'intervalle et dans des conditions qui nous paraissaient analogues, pouvaient varier dans des proportions importantes.

La réaction d'équilibre étant influencée par le pH et les quantités respectives de corps en présence (fuschine, anhydride sulfureux, aldéhydes), la composition du réactif a une incidence très importante sur la coloration développée.

Les travaux effectués sur ce réactif, en particulier ceux de P. RUMPF (24) ont montré :

a) qu'il est nécessaire d'opérer en présence d'un excès d'anhydride sulfureux, car c'est le seul cas où il y a formation d'un composé coloré unique.

b) que le réactif doit être nettement acide de manière à rester incolore en l'absence d'aldéhydes (pH voisin de 2) et à limiter la formation d'acide aldéhydoso-sulfureux, ce dernier corps ne donnant pas de coloration au réactif de SCHIFF.

Le réactif proposé par la méthode officielle est une solution dans l'alcool à 50°C de fuschine, en présence de bisulfite de soude et acidifiée par l'acide sulfurique.

1° *Influence du pH :*

Pour une quantité d'anhydride sulfureux constante, les variations de pH ont une influence considérable sur l'intensité colorante développée (voir graphique).

Le tableau suivant donne quelques chiffres trouvés en faisant varier le pH.

pH du mélange prise d'essai et Réactif de SCHIFF	Densités optiques lues à l'élec- trophotomètre — solution à 50 γ Éthanal ml Réactif de SCHIFF à 27 g SO ₂ /litre
1,4	25
1,5	42
1,6	60
1,7	80
1,9	95
2,2	92

Des variations de 0,05 unité pH peuvent provoquer des erreurs de 10 p. 100.

Les variations accidentelles de pH ne sont pas à craindre, car le milieu est assez fortement tamponné (tampon = acide sulfurique — sulfate de soude).

Il conviendra cependant au moment de la préparation d'une nouvelle quantité de réactif d'avoir en présence dans ce réactif toujours la même quantité d'acide sulfurique et de sel de cet acide, de manière à reconstituer toujours le même mélange tampon.

En conséquence :

a) Il conviendra de préparer le bisulfite de Rosaniline dans l'eau et non dans l'alcool à 50°C comme l'indique la méthode officielle. En effet, dans l'alcool à 50°C la solubilité des sels de soude est plus faible ; la solution qui est au voisinage de la saturation laisse déposer des sels quand la température s'abaisse, le pH se trouve modifié.

L'emploi d'alcool avait été proposé (25) car ce corps est un catalyseur négatif d'oxydation de l'anhydride sulfureux, or le rôle de l'alcool n'est appréciable qu'à pH > 3, ce qui n'est pas le cas ; d'autre part, nous verrons que la teneur en anhydride sulfureux n'est pas très critique.

L'abandon de l'alcool ne présente que des avantages. D'ailleurs, MOHLER (26) avait déjà proposé de préparer le réactif dans l'eau, car le réactif préparé dans l'alcool peut se colorer de lui-même quand la température s'élève.

b) Il conviendra également d'utiliser des produits purs, en quantité rigoureusement déterminée.

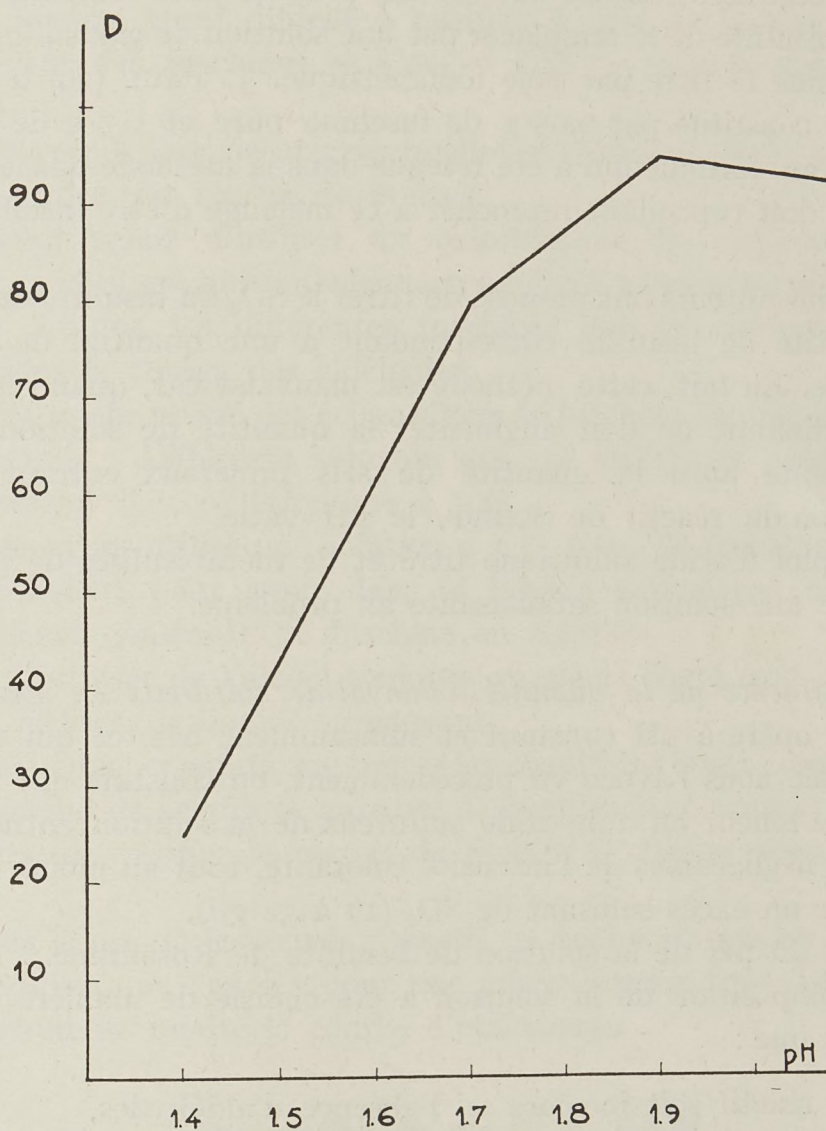


FIG. 5. — Évolution de la coloration en fonction du PH.

1° La quantité d'acide sulfurique au 1/4 préconisée par la méthode officielle serait avantageusement remplacée par une quantité d'acide sulfurique 2 ou 3 N soigneusement titrée.

En effet : une différence de 5 p. 100 dans le titre de l'acide sulfurique utilisé entraîne une erreur de 4 p. 100. Or, aucun acide RP n'a la même concentration (nous avons trouvé des variations de pureté de 90 à 97 p. 100).

2° Le bisulfite de soude qui n'existe qu'en solution (27) est

formé surtout en réalité d'un mélange de pyrosulfite, sulfite et sulfate (28).

Les solutions s'oxydent à l'air. Il se fait du sulfate et des produits intermédiaires : sulfite neutre, hyposulfite. La composition de ces solutions varie dans des proportions très importantes. Ce produit devra être remplacé par du métabisulfite de potassium pur qui est beaucoup plus stable à l'état sec. Certains auteurs ont proposé pour remédier à l'instabilité du bisulfite de le remplacer par une solution de gaz sulfureux dont on détermine le titre par voie iodométrique. J. PAUL (29) a préconisé un réactif constitué par 0,05 g de fuschine pure et 0,5 g de SO_2 dans 100 ml d'eau, formule qui a été retenue dans la méthode officielle américaine. On doit cependant reprocher à ce mélange d'être insuffisamment tamponné.

Certains auteurs ont proposé de titrer le SO_2 du bisulfite et d'utiliser une quantité de bisulfite correspondant à une quantité de SO_2 bien déterminée. En fait, cette méthode est mauvaise car, quand le titre du bisulfite diminue on doit augmenter la quantité de solution utilisée. On augmente ainsi la quantité de sels minéraux entrant dans la composition du réactif de SCHIFF, le pH varie.

L'emploi d'acide sulfurique titré et de métabisulfite de potassium pur donne une solution satisfaisante au problème.

2° Influence de la quantité d'anhydride sulfureux en solution.

Si on opère à pH constant et suffisamment bas, ce qui est nécessaire comme nous l'avons vu précédemment, on constate que les variations de la teneur en anhydride sulfureux de la solution entraînent des variations négligeables de l'intensité colorante, tout au moins quand on opère avec un excès suffisant de SO_2 (16 à 32 g/l).

Choix du pH de la solution de bisulfite de Rosaniline.

La composition de la solution a été choisie de manière à obtenir un pH tel que :

- le réactif soit incolore en l'absence d'aldéhydes,
- la formation d'acide aldéhydoso-sulfureux soit réduite le plus possible,
- le milieu soit fortement tamponné,
- les densités optiques soient pratiquement indépendantes de la teneur en SO_2 entre 16 et 32 g/l.

A la suite de nombreux essais, nous avons déterminé que le pH optimum du mélange de la prise d'essai d'alcool à 50° et de réactif était voisin de 1,5. (Cette valeur lue au pH-mètre à électrode de verre n'a pas de signification précise en raison de la présence de l'alcool (30), cependant elle constitue un repère commode.)

Influence de la fuschine

La fuschine, ou chlorhydrate de Rosaniline est le type des colorants dérivés du triphénylméthane. La Rosaniline la plus simple est la pararosaniline, base azotée en C₁₉ ; tous les autres sont des homologues supérieurs.

Ce produit étant difficile à purifier, à côté de la fuschine en C₁₉ se trouvent des fuschines en C₂₀ — C₂₁ — C₂₂ de propriétés très voisines.

Il convient donc de préciser quelle est l'influence de la fuschine dans la préparation du réactif de SCHIFF.

L'idéal serait d'utiliser du chlorhydrate de pararosaniline pur, mais ce produit est pratiquement impossible à trouver commercialement. D'après RUMPF, les différentes fuschines ont un comportement très voisin dans le dosage des aldéhydes.

Nous avons utilisé des échantillons de fuschine *basique* pure R. A. L.

Solvants : Différents solvants ont été utilisés et finalement nous avons retenu l'alcool éthylique à 95°.

Nous avons utilisé une solution à 1 p. 1 000 de fuschine.

Il convient pour avoir dans le liquide surnageant une quantité sensiblement constante de fuschine en solution :

— D'utiliser de l'alcool toujours au même degré (soit 95°).

On utilisera le liquide surnageant.

Nous avons constaté que toutes les conditions étant conservées identiques, quand on accroît la quantité de fuschine la coloration croît. Il convient donc de vérifier le réactif de SCHIFF à chaque préparation nouvelle.

Dans le cas où le nouveau réactif ne donnerait pas les mêmes densités optiques que l'ancien pour une même liqueur type d'aldéhydes, il conviendrait de refaire la courbe d'étalonnage.

Préparation du réactif de Schiff

En tenant compte des considérations précédentes, le réactif se prépare ainsi :

— Faire dissoudre 8 g de métabisulfite de K pur dans 150 ml d'eau bidistillée.

— Ajouter 30 ml de solution à 1 p. 1 000 de fuschine basique dans l'alcool éthylique à 95°.

— Ajouter 55 ml de SO₄ H₂ 3 N.

— Compléter à 250 ml avec de l'eau bidistillée.

Ce réactif sera conservé en flacon rodé en verre coloré.

Quantité de réactif de Schiff à utiliser

Nous avons constaté qu'il existe pour un réactif de SCHIFF donné une dose optima à laquelle correspond la coloration finale la plus intense.

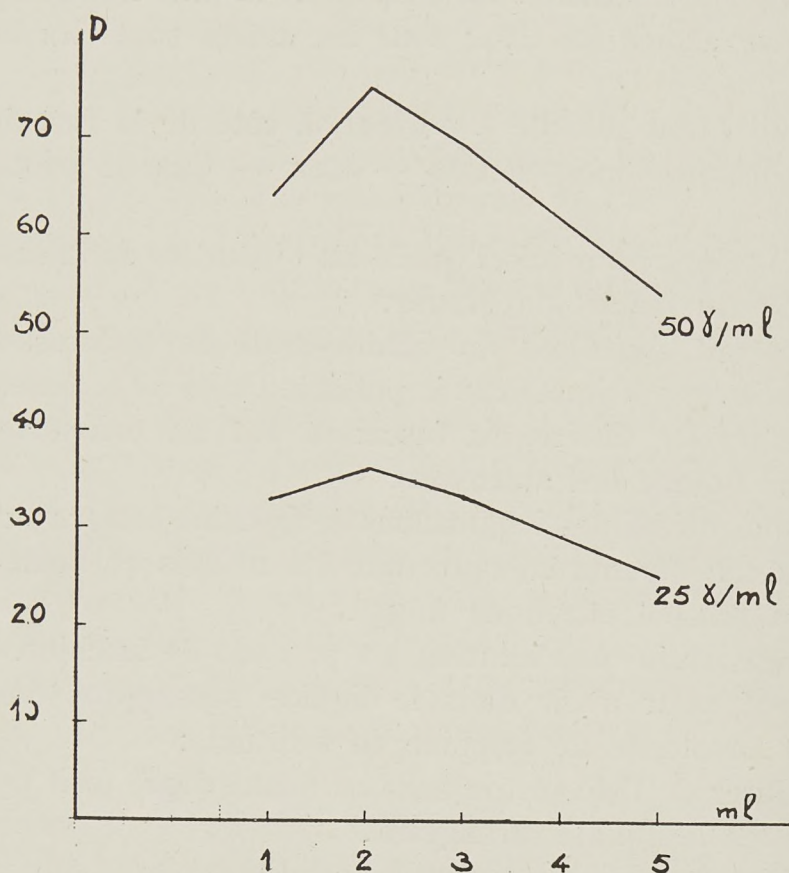


FIG. 6. — Évolution de la coloration en fonction de la quantité de réactif de Schiff.

Nous avons essayé sur une solution alcoolique titrant 50°C et renfermant des doses de 10 à 20 gr Éthanal/hl alcool pur des volumes variables de réactif de SCHIFF.

Influence du volume de réactif de Schiff utilisé

Ethanal par ml	25 γ					50 γ				
Vol. réactif SCHIFF en cc...	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Lecture à l'électrophotomètre.	34	36,5	33	29,5	25	64,5	73	69,5	62,5	54

Il résulte de ces essais qu'avec le réactif considéré la sensibilité maximum est obtenue avec 2 cc de réactif dans les deux cas. Nous avons obtenu un résultat très voisin avec le réactif préconisé par la méthode officielle. Nous avons choisi un volume de 2,5 ml, car les variations de volume autour de 2,5ml entraînent des variations d'intensité colorante très faible.

Influence de la durée du temps de contact à 25°C

En utilisant 2,5 ml de réactif de SCHIFF préparé suivant les indications précédentes pour 10 ml de prise d'essai d'alcool à 50 °C, nous avons obtenu à 25°C une évolution de la coloration en fonction du temps analogue à celle obtenue avec le réactif préconisé par la méthode officielle : l'observation doit se faire également au bout de 20 minutes.

Alcool utilisé pour faire les dilutions

Dans les conditions définies précédemment on obtient une coloration qui permet un dosage correct de l'Éthanal, jusqu'à :

14 g Éthanal/hl alcool à 100°.

Pour les teneurs plus élevées, il est nécessaire de faire des dilutions.

L'alcool à 50°C utilisé pour la dilution doit être totalement exempt d'aldéhydes. Or, on ne peut trouver dans le commerce d'alcool même RP exempt d'aldéhydes. En effet, l'alcool à degré élevé s'oxyde lentement à l'air et à la lumière (31). Il est donc nécessaire de le purifier au laboratoire. Diverses méthodes ont été proposées dans ce but (32). Elles reposent toutes sur le principe suivant : faire bouillir l'alcool au réfrigérant ascendant pendant une heure avec un corps formant avec les aldéhydes une combinaison stable, que l'on peut séparer ensuite par distillation.

L'emploi du chlorhydrate de phénylène diamine méta a été proposé par GIRARD et ROCQUES (33).

L'emploi de phosphate d'aniline a été préconisé par MOHLER. Selon SAGLIER, ce corps donne une combinaison peu stable qui peut être détruite si la distillation est poussée trop loin (méthode officielle).

L'emploi de l'oxyde d'argent en présence d'une base a été préconisé par FELLEBERG. Dans ces conditions, l'Acétal reste stable et il est nécessaire de l'hydrolyser au préalable.

Comparaison des trois méthodes.

Nous avons utilisé une solution d'Acétal dans l'alcool à 50°C. Cette solution correspondait à une teneur de 50 g Éthanal hl alcool pur.

Nous avons fait quatre échantillons de 100 ml :

— L'échantillon n° 1 a reçu une addition de 2 g de chlorhydrate de phénylène diamine méta.

— L'échantillon n° 2 a été additionné de 1 ml d'aniline pure et 1,5 mg d'acide phosphorique.

— L'échantillon n° 3 a été additionné de :

2 ml NaOH/N
30 mg NO₃ Ag.

Ces trois échantillons ont été soumis à ébullition pendant une heure puis distillés.

Le dosage des aldéhydes totaux a été effectué par la méthode JAULMES sur le distillat. Le résultat a été exprimé en g Éthanal/hl alcool à 100°C, par rapport au volume initial.

— L'échantillon n° 4 a été additionné de 0,01 ml de SO_4H_2 1/2 et soumis à l'ébullition à reflux pendant 15 minutes. Après refroidissement, l'échantillon a été neutralisé puis additionné de :

2 ml NaOH/N

30 mg NO_3 Ag.

Après ébullition à reflux pendant 1 heure, le liquide a été distillé, le dosage de l'Éthanal total a été effectué sur le distillat.

Echantillons	Ethanal total en g par hl 100 c sur le distillat
N° 1 (Chlorhydrate de phénylène diamine méta)	0,20 g
N° 2 (Phosphate d'aniline)	0,80 g
N° 3 (Oxyde d'argent + soude)	45 g
N° 4 (Oxyde d'argent soude après hydrolyse de l'acétal)	8 g

Aucune méthode ne permet l'élimination totale de l'Éthanal. La méthode au chlorhydrate de phénylène diamine méta est beaucoup plus satisfaisante que les autres. En l'appliquant à des alcools contenant peu d'aldéhydes on obtient une fixation presque totale (moins de 0,1 g par hl d'alcool pur).

IONESCU et GEORGESCU ont préconisé l'emploi de ce corps et ont également obtenu de bons résultats (34).

Conclusion

La coloration développée par le réactif de SCHIFF en présence d'aldéhyde n'obéit pas à la loi de BEER et ne permet un dosage correct des aldéhydes que dans les conditions suivantes :

- Observation en lumière monochromatique (ou dans une bande étroite de longueurs d'ondes).
- Teneur en aldéhyde inférieure à 14 g/hl d'alcool pur.
- pH voisin de 1,5 et maintenu constant.
- Température constante.
- Concentration en anhydride sulfureux maintenue entre certaines limites et si possible constante.

Les remarques précédentes mettent en évidence les imperfections de la méthode officielle. Dans le cas d'une observation colorimétrique avec comparaison avec un témoin traité de la même façon que l'alcool examiné, une certaine compensation des erreurs est réalisée. Cependant, la compensation n'est totale que lorsque l'alcool examiné présente la

même teneur que le témoin. Dès que cette teneur en diffère sensiblement, les erreurs peuvent devenir importantes.

Technique opératoire proposée

Pour ce dosage, nous nous servons de tubes à essai bouchés émeri.

Hauteur 20 cm.

Diamètre 15 mm.

Réactif de SCHIFF :

Introduire 8 g de métabisulfite de potassium pur dans une fiole jaugée de 250 ml, le dissoudre à l'aide de 150 ml d'eau bidistillée. Ajouter 30 ml de solution de fuschine à 1 p. 1 000 dans l'alcool éthylique à 95°C sans aldéhyde. Ajouter 55 ml d'acide sulfurique 3 N.

Compléter à 250 ml avec de l'eau bidistillée.

Conserver le réactif dans un flacon rôdé en verre coloré.

Introduire dans les tubes à essais secs :

1° 10 ml de distillat à 50 c.

(Si ce distillat a une teneur en aldéhyde supérieure à 14 g/hl alcool pur, le diluer avec de l'alcool à 50°C exempt d'aldéhydes).

2° Ajouter 2,5 ml de réactif de SCHIFF. Prendre soin d'agiter immédiatement après addition de SCHIFF, le tube étant bien bouché. Laisser en contact au bain-marie à 25°C pendant 20 minutes.

3° Colorimétrer à l'électrophotomètre sous une épaisseur de 10 mm, se reporter à la courbe établie point par point dans les mêmes conditions.

Chaque fois qu'on prépare une nouvelle quantité de réactif de SCHIFF on devra vérifier, grâce à une solution type d'Acétal à 10 g Éthanal/hl que le point trouvé se trouve bien sur la courbe à 10 g. Si ce n'est pas le cas, il faudra refaire la courbe.

Si l'examen est effectué au colorimètre DUBOSC, il sera fait par rapport à un témoin contenant 10 g Éthanal par hl d'alcool pur. L'interprétation des chiffres trouvés sera faite grâce à une courbe établie point par point dans les mêmes conditions.

Construction de la courbe d'étalonnage

On effectuera une solution type à 20 g Éthanal/hl 100 c rigoureusement exacte.

A partir de cette solution, on pourra effectuer des dilutions avec de l'alcool à 50°C exempt d'aldéhydes.

On obtiendra par exemple des solutions à 2,5 — 5 — 7,5 — 10 — 12,5 g Éthanal/hl 100 c.

(Avec l'électrophotomètre que nous utilisons ces dilutions sont en nombre suffisant car la courbe d'étalonnage obtenue est une droite).

En traitant 10 ml de chaque dilution dans les conditions opératoires indiquées précédemment on pourra construire la courbe d'étalonnage.

Valeur de la méthode proposée

La valeur des résultats trouvés dépend de l'exactitude de la solution type qui a servi à l'étalonnage.

1° Dans les solutions alcooliques pures d'Éthanal ou d'Acétal à 50 c.

La précision dans ce cas atteint 1 p. 100.

2° Dans les eaux-de-vie ou alcools.

Afin d'étudier l'influence des impuretés perturbatrices possibles, des additions de différentes doses d'éthanal ont été faites dans le distillat à 50 c d'eaux-de-vie de différentes origines.

Le tableau suivant donne les résultats pour une eau-de-vie particulièrement riche en non alcool.

Echantillons	Ethanal ajouté en g/hl à 100°	Ethanal en g/hl d'alcool pur chiffre trouvé
N° 1	50	T + 48
N° 2	73	T + 74
N° 3	110	T + 112

L'erreur maximum est de 4 p. 100, ce qui ne fait pas plus de 2 p. 100 pour le dosage puisque les résultats sont obtenus par différence de deux dosages.

Comparaison avec la méthode JAULMES de dosage de l'Éthanal total :

1° Dans les solutions pures d'Éthanal ou d'Acétal à 50 c les différences entre les deux méthodes ne dépassent pas 1 p. 100.

2° Dans les eaux-de-vie ou alcools.

a) Alcools ne contenant pas de furfurol : les différences ne dépassent pas 3 p. 100.

b) Eaux-de-vie contenant du furfurol.

La méthode JAULMES donne des chiffres systématiquement plus forts, car le furfurol consomme un peu d'iode alors qu'il ne donne pas de coloration appréciable avec le réactif de SCHIFF.

Les différences ne sont jamais élevées, car le furfurol n'existe qu'en quantité très faible dans les eaux-de-vie (maximum 4 g/hl d'alcool pur).

Il serait d'ailleurs facile de corriger le résultat obtenu par la méthode JAULMES en retranchant du résultat donné par cette méthode l'équivalent en éthanal du furfurol dosé par ailleurs. La correction ne dépasse jamais 2 g/hl car 1 g de furfurol correspond à 0,46 g d'Éthanal).

Comparaison avec la méthode officielle

La dispersion des résultats trouvés par différents laboratoires pour un même échantillon analysé par la méthode officielle a dépassé 40 p. 100 dans une chaîne *officielle* d'analyses.

Pour un même laboratoire, la dispersion reste importante quand on analyse un même échantillon chargé en aldéhydes à quelques mois d'intervalle.

Exemple : Alcool du Midi à 75 c.

Première analyse :

Méthode JAULMES	93 g/hl à 100 c
Méthode colorimétrique proposée	95 g —
Méthode officielle	80 g —

Analyse effectuée 2 mois plus tard :

Méthode JAULMES	93 g —
Méthode colorimétrique proposée	94 g —
Méthode officielle	108 g —

La méthode proposée, très commode, donne dans les conditions courantes d'utilisation une précision d'au moins 5 p. 100 ce qui semble suffisant pour les analyses d'eaux-de-vie.

V. — CONCLUSION

Nous souhaitons que la méthode JAULMES soit adoptée comme méthode de référence en raison de sa fidélité et que la méthode colorimétrique soit tolérée pour l'analyse de contrôle des eaux-de-vie avec les modifications apportées. La méthode JAULMES servira à étalonner les liqueurs types et sera préférée à la méthode colorimétrique dans le cas de dosages de très petites quantités d'aldéhydes (alcools rectifiés) ou de grandes quantités (alcools de marcs). La méthode colorimétrique proposée pourrait être couramment utilisée dans le cas des eaux-de-vie naturelles d'origine vinique dont la teneur en aldéhydes est comprise entre des limites assez étroites (38). Elle pourrait éventuellement être utilisée dans les alcools très riches en aldéhydes à condition de faire des dilutions convenables.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) HOEPNER. — Unter Nahr Genuss, **34**, p. 483, 1917. — TOURLIÈRE (S.), ANDRES (P.). — *Ind. Agr. Al.*, p. 472, 1951.
- (2) JAULMES (P.), ESPEZEL (P.). — *Bull. Pharm. Sud-Est*, p. 295, 1932. — JAULMES (P.), ESPEZEL (P.). — *Ann. Fals. Fraud.*, p. 325, 1935. — ESPEZEL (P.). — Thèse Pharm., 1952, Montpellier.
- (3) PEYNAUD (E.), MAURIE (). — *Bull. O.I.V.*, p. 42, 1938.

- (4) RIBEREAU GAYON (J.), PEYNAUD (E.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **73**, p. 177, 1947.
 - (5) JAULMES (P.), DIEUZÈDE (J. C.). — Le dosage de l'Acétaldéhyde dans les spiritueux. *Ann. Fals. Fraudes*, p. 9, 1954.
 - (6) SCHIFF. — *Lieb Ann.*, **140**, p. 92, 137, 1866.
 - (7) MEYER (V.), CARO. — *Ber deut Chem Gesells*, **13**, p. 2342-2345, 1880.
 - (8) SCHMIDT (J. C.). — *Ber deut Chem Gesells*, **13**, p. 1848-1851, 1880.
 - (9) GAYON (V.). — *Cr. Ac. Sc.*, **105**, p. 1182-1183, 1187.
 - (10) — Alcools, eaux-de-vie et liqueurs. *J. O.*, 18 février 1907.
 - (11) TOURLIÈRE (S.), ANDRÈS (P.). — *Ind. Agr. Alim.*, p. 472, 1951.
 - (12) JAULMES (P.). — Mises au point de chimie analytique et d'analyse bromatologique, p. 66, 1953. Masson éd., Paris.
 - (13) JACQUIN (P.), TAVERNIER (J.). — *Ann. de Technologie de l'I.N.R.A.*, **11**, p. 113-136, 1953.
 - (14) DENIGES (G.). — *Cr. Ac. Sc.*, **150**, p. 529-531, 1910.
 - (15) FRANÇOIS (M.). — *J. Pharm. Chim.*, p. 65-77, 1913. — BIDDLE (H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **35**, p. 273-281, 1883. — DURSCHNABEL (K.), WEIL (H.). — *Ber deut Chem Gesells*, **38**, p. 3492-3496, 1905. — BELLA VON BITTO. — *An. Chem.*, **36**, p. 373-376, 1897.
 - (16) URBAIN (G.). — *Bull. Soc. Chim.*, **15**, p. 455-456, 1896.
 - (17) WIELAND, SCHLEUNG. — *Ber deut Chem Gesells*, **54**, p. 2527-2555, 1921.
 - (18) RUMPF (P.). — *Bull. Soc. Chim.*, **51**, p. 503, 1932. Thèse doct. Sc., 1935, Paris.
 - (19) GIRARD (Ch.), CUNIASSE (L.). — Manuel pratique d'analyse des alcools, p. 189, 1899, Masson éd., Paris.
 - (20) BONIS (A.). — *Ann. Fals. Fraudes*, **1**, 86, 1908.
 - (21) RUMPF (P.). — Thèse doct. Sc., n° 2399, Paris.
 - (22) GIRARD (Ch.), CUNIASSE (L.). — Manuel pratique d'analyse des alcools, p. 183, 1899, Masson éd., Paris.
 - (23) (24) RUMPF (P.). — Thèse doct. Sc., n° 2399, p. 41-42, 1935, Paris.
 - (25) ROCQUES (X.). — Eaux-de-vie, p. 41, 1913, Béranger éd., Paris.
 - (26) MOHLER. — *Cr. Ac. Sc.*, **121**, 187, 1890.
 - (27) FORESTER, BROSCHE, NORBERG, SCHULZ. — *Chem.*, **110**, 456, 1924.
 - (28) HARRISSON, CAROLL. — *J. Soc. Chem. Ind. Trans.*, **44**, 1, 1925.
 - (29) PAUL (J.). — *Ann. Chem.*, **35**, 647, 1896.
 - (30) GAUTHIER (J. A.). — Mises au point de chimie analytique et d'analyses bromatologiques, p. 31-50, 1943. Masson éd., Paris. — LEVASSEUR (A.). — *Cr. Ac. Sc.*, mai 1949. — LEVASSEUR (A.). — *Rev. Gén. Sc. pure et App.*, **56**, 1949.
 - (31) MARILLER (Ch.). — Distillerie Agricole et Industrielle, p. 6, 1951. Bailières éd., Paris.
 - (32) KERVEGHAN (D.). — Rhums et Eaux-de-vie, p. 397, 1951, éd. du Golfe, Vannes.
 - (33) GIRARD (Ch.) et ROCQUES (X.). — *Cr. Ac. Sc.*, **107**, p. 1158, 1888.
 - (34) IONESCU (M.), GEORGESCU (V.). — *Bull. Soc. Chim.*, **4**, 53, 1953.
 - (35) BONIS (A.), MOROY (M^{lle}). — *Ann. Fals. Fraudes*, p. 380, 1948.
-

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1954

I. — Mémoires Originaux

MOCQUOT (G.), ALAIS (C.) et CHEVALLIER (R.). — Étude sur les défauts de coagulation du lait par la présure	I
GALZY (P.) et EVESQUE (J. M.). — A propos de la maturité des raisins de table	45
PUISSANT (A.). — L'oxydation sulfo-chromique de l'acide tartrique et son dosage dans les moûts de vins	57
CHARPENTIE (Y.). — Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins	89
BOURDET (A.) et PETIT (L.). — Influence de la nature des mélasses sur l'activité fermentaire des levures de boulangerie	169
CORDONNIER (R.). — Élimination du cuivre dans les Eaux-de-vie par les Phytates de Calcium et de Sodium.	179
ANDRÉ (E.) et DELAVEAU (P.). — Recherches chimiques sur la composition des essences sulfurées des graines de colza.	193
JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — Contribution à l'étude des principaux constituants des poires à poiré au cours de la croissance et de la maturation.	209
OURNAC (M ^{lle} A.). — Teneur en acide ascorbique des différentes parties du raisin.	231
JAULMES (P.) et HAMELLE (M ^{lle} G.). — Composition et emploi de vins concentrés par le froid à fort degré alcoolique	241
OURNAC (M ^{lle} A.). — Migration de la Vitamine C et du facteur P des éléments solides du raisin dans les jus élaborés par le procédé : sulfitation-macération-désulfitation	269
LAFOURCADE (M ^{lle} S.). — Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin.	283
LAFON (J.) et COUILLAUD (P.). — Comparaison de différentes méthodes de dosage des aldéhydes dans les eaux-de-vie	335

II. — Documentation

DEIBNER (L.). — Activité physiologique du Vin et du raisin	69
CREFF (R.). — Tanins, polyphénols et pigments colorés des cidres, leur rôle éventuel dans les phénomènes d'oxydation et de réduction en cidrerie.....	258

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 14-3-1955.

Dépôt légal: 1^{er} trimestre 1955

N° d'impression: 675